



HAL
open science

Le pouvoir pathogène des salmonelles : facteurs de virulence et modèles d'étude

Yves Millemann

► **To cite this version:**

Yves Millemann. Le pouvoir pathogène des salmonelles : facteurs de virulence et modèles d'étude. Veterinary Research, 1998, 29 (5), pp.385-407. hal-00902534

HAL Id: hal-00902534

<https://hal.science/hal-00902534>

Submitted on 11 May 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.

Article de synthèse

Le pouvoir pathogène des salmonelles : facteurs de virulence et modèles d'étude

Yves Millemann*

Laboratoire d'écopathologie microbienne, station de pathologie aviaire et parasitologie,
centre de recherche Inra de Tours, 37380 Nouzilly, France

(Reçu le 26 août 1997 ; accepté le 3 mars 1998)

Abstract – Pathogenicity of Salmonellae: virulence factors and study models. Salmonellae are potentially pathogenic for humans as well as for numerous animal species. They possess numerous virulence factors, which allow them to adapt to various environmental conditions and to host response at each step of the pathogenic process. Key-steps such as the invasion of epithelial cells or survival within macrophages have been extensively studied. These studies have led to the discovery of an original protein secretion system and have demonstrated the existence of pathogenicity islands. This considerable progress is due to the development of numerous *in vitro* and *in vivo* models and of new identification strategies for the implicated genes. Recently, many original and elegant strategies have been recently proposed. © Inra/Elsevier, Paris

Salmonella / virulence / gene / invasion / survival / study model

Résumé – Les salmonelles sont potentiellement pathogènes pour l'homme et de nombreuses espèces animales. Elles possèdent de nombreux facteurs de virulence, leur permettant à chaque étape de la pathogénie de s'adapter aux conditions de l'environnement et à la réponse de l'hôte. Des étapes-clés, comme l'invasion des cellules épithéliales et la survie dans les macrophages, ont été très étudiées, débouchant sur la découverte d'un système de sécrétion protéique original et la mise en évidence de véritables îlots de pathogénicité. Ces progrès considérables dans la connaissance ont été permis par le développement de nombreux modèles d'étude *in vitro* et *in vivo*, et de stratégies d'identification des gènes impliqués. Certaines de ces stratégies, originales et élégantes, ont été développées récemment. © Inra/Elsevier, Paris

Salmonella / virulence / gène / invasion / survie / modèle d'étude

* Correspondance et tirés à part : Pathologie du bétail, LEGSA, DPASA, École nationale vétérinaire d'Alfort, 94704 Maisons-Alfort cedex, France
E-mail : millemann@vet-alfort.fr

1. Introduction	386
2. Pathogénie, rôle des facteurs de virulence.....	387
2.1. Principales étapes de la pathogénie des infections à <i>Salmonella</i>	387
2.2. Rôle des îlots de pathogénicité.....	389
2.2.1. Invasion des cellules-hôtes épithéliales.....	389
2.2.1.1. Les différentes étapes.....	389
2.2.1.2. Les gènes impliqués.....	391
2.2.2. Survie dans les macrophages.....	392
2.2.2.1. Caractéristiques de la survie intramacrophagique	392
2.2.2.2. Les gènes impliqués.....	393
2.3. Autres fonctions mises en jeu dans les différentes étapes de la pathogénie	395
2.3.1. Adhésion aux cellules-hôtes épithéliales.....	395
2.3.2. Survie dans le sérum.....	395
2.3.3. Rôle du plasmide de virulence.....	395
2.3.4. Système de captation du fer.....	396
2.3.5. Rôle des toxines.....	396
2.4. Gènes de l'hôte affectant la sensibilité à l'infection	397
3. Modèles d'étude de la pathogénicité des salmonelles.....	397
3.1. Identification de gènes impliqués dans la virulence	397
3.1.1. Stratégies utilisées	397
3.1.2. Recherche de gènes exprimés in vivo.....	398
3.2. Modèles d'étude in vivo	399
3.3. Modèles d'étude in vitro.....	400
3.3.1. Monocouches semi-confluentes de cellules épithéliales	400
3.3.2. Monocouches épithéliales polarisées.....	400
3.3.3. Macrophages en culture.....	401
4. Conclusion.....	401

1. INTRODUCTION

La plupart des sérotypes de salmonelles connus sont pathogènes pour l'homme, l'animal ou bien les deux comme *Salmonella* Typhimurium (STm) ou *S. Enteritidis* (SE). Chez l'homme, *S. Typhi* est responsable de fièvres typhoïdiques. Les sérotypes ubiquistes, tels que STm et SE déterminent, lorsque la dose infectante est importante (10^5 – 10^6 bactéries), des gastro-entérites d'origine alimentaire, avec diarrhées, douleurs abdominales, nausées, vomissements. Chez les enfants, les vieillards ou les immunodéprimés des doses plus faibles suffisent à déclencher la pathologie. Chez les nour-

rissons prématurés et les immunodéfi-cients, ces infections d'origine digestive peuvent évoluer vers une septicémie ou une méningite. Chez l'animal, les salmonelles sont à l'origine de tableaux cliniques variés. *S. Abortusovis* et *S. Abortusequi* qui sont respectivement responsables d'avortements chez la brebis et la jument, STm et *S. Dublin* de septicémies néonatales et d'entérites chez les bovins. *S. Pullorum* et *S. Dublin* de diarrhée respectivement chez les jeunes poulets et les jeunes veaux. Une immunodépression liée au parasitisme ou à un jeûne peut augmenter la sensibilité de l'animal aux infections par salmonelles.

Plusieurs modèles d'étude, *in vivo* et *in vitro*, ont été développés pour aborder les différentes phases de la pathogénie des salmonelloses. Ceux-ci ont permis des progrès considérables ces dernières années dans la connaissance des mécanismes impliqués dans le dialogue hôte-bactérie au cours d'une infection, et dans la compréhension des bases moléculaires de la pathogénicité des salmonelles, notamment avec la découverte d'un complexe de sécrétion protéique associé à l'invasion des cellules épithéliales par *Salmonella*. Cette évolution rapide des connaissances s'est appuyée sur la découverte de nombreux gènes impliqués dans cette pathogénie complexe. Des thèmes ou des stratégies commun(e)s à différents organismes pathogènes ont ainsi pu être soulignés [41]. La connaissance fine des mécanismes utilisés par les microorganismes pour causer infection et maladie pourrait déboucher sur le développement de meilleurs moyens de contrôle des infections microbiennes. En outre, la similarité des stratégies et des facteurs de virulence de différents microorganismes fournit une aide à la connaissance de l'évolution de la pathogénicité microbienne.

La pathogénie des infections à salmonelles a été particulièrement étudiée, et si des zones d'ombres subsistent, les grandes étapes sont désormais assez bien connues. Nous reviendrons ainsi sur les étapes majeures de cette pathogénie et détaillerons les facteurs de virulence impliqués.

2. PATHOGÉNIE, RÔLE DES FACTEURS DE VIRULENCE

Les facteurs de virulence sont des produits bactériens nécessaires aux microorganismes pour provoquer une maladie. Les caractéristiques essentielles de la pathogénie des salmonelles sont leur capacité à entrer dans les cellules-hôtes et

à y demeurer comme parasite intracellulaire facultatif [40].

2.1. Principales étapes de la pathogénie des infections à *Salmonella*

Ces infections sont généralement à point de départ intestinal. Après une phase de colonisation, les salmonelles se multiplient dans le tube digestif. Le cæcum, lieu de multiplication, semble jouer un rôle important dans l'infection [29]. Dans l'intestin, les bactéries interagissent avec la face apicale des cellules épithéliales, formant des appendices appelés invasomes [55] ; elles provoquent simultanément une dégénérescence des microvillosités et de la bordure en brosse, et induisent des ondulations membranaires des cellules épithéliales [48]. Les salmonelles sont alors observées entre et dans les cellules épithéliales, à l'intérieur d'une vacuole (*figure 1*).

La bordure en brosse se régénère ensuite et les bactéries sont observées dans des vacuoles, dans les phagocytes de la lamina propria.

La majorité des bactéries s'associent préférentiellement dans l'intestin aux cellules M des plaques de Peyer [25] ; l'internalisation est rapidement suivie de la destruction des cellules M [33, 80].

Une période de latence de plusieurs heures précède la phase de multiplication intracellulaire intense des salmonelles [45]. Après 12–24 h de multiplication intracellulaire, la plupart des cellules présentent de larges vacuoles remplies de salmonelles.

Les phagocytes recrutés dans la réaction inflammatoire intestinale sont principalement des polynucléaires neutrophiles (hétérophiles chez les oiseaux) et éosinophiles, ainsi que des monocytes. Les bactéries phagocytées ne sont pas détruites par les macrophages. Après une bactériémie transitoire, les bactéries sont retrou-

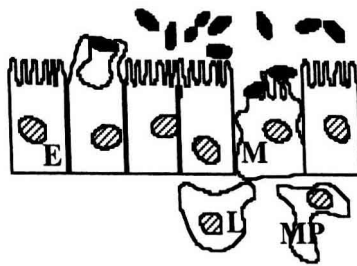
vées dans les nœuds lymphatiques régionaux (ou les nodules pariétaux et viscéraux des oiseaux) et dans les macrophages du foie et de la rate [35, 95], organes pour lesquels les salmonelles ont

un tropisme particulier. Il s'agit d'un parasite intracellulaire facultatif. Les salmonelles peuvent se multiplier dans ces organes avant d'être disséminées par voie sanguine [39].

lumière intestinale

- anaérobie
- nutriments

Salmonella



ETAPE 1

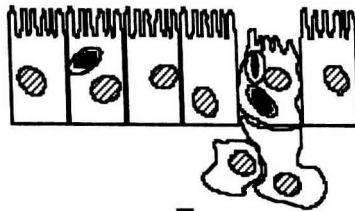
Adhésion et invasion

- gènes *inv* et *prgH* induits
- gènes *spv* et *pagC* réprimés



Epithélium

- anaérobie
- carence en nutriments



ETAPE 2

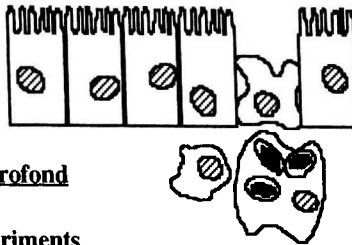
Pénétration de l'épithélium

- gènes *inv*, *prgH* et *pagC* réprimés
- gènes *spv* induits



Tissu lymphoïde profond

- oxygène
- carence en nutriments



ETAPE 3

Infection du tissu lymphoïde

- gènes *inv* et *prgH* réprimés
- gènes *spv* et *pagC* induits

Figure 1. Représentation schématique de l'expression séquentielle des gènes lors des différentes étapes de la pathogénie après infection orale par *Salmonella*. (d'après [22, 118])

E : cellules épithéliales ; M : cellules M des plaques de Peyer ; MP : macrophages ; L : lymphocytes.

Les sérotypes responsables de gastroentérites chez l'homme tels que STm et SE ne pénètrent généralement pas au-delà de la membrane basale de l'épithélium intestinal. Chez des individus plus fragiles ou immunodéprimés, ces bactéries peuvent pénétrer le système réticuloendothélial et provoquer une maladie systémique grave.

Lors de gastroentérite, les symptômes sont liés en partie à la sécrétion d'une entérotoxine mais surtout à la destruction des villosités avec perturbation des fonctions d'absorption et à une inflammation importante augmentant les sécrétions [33, 39]. Lors de maladie septicémique, l'entérotoxine libérée par la lyse des bactéries est responsable du choc toxique [33].

2.2. Rôle des îlots de pathogénicité

De nombreux facteurs de virulence interviennent dans les principales étapes de la pathogénie (figure 2). Des étapes

essentielles de cette pathogénie sont sous la dépendance de facteurs de virulence codés par des gènes organisés en blocs sur le chromosome, qualifiés « d'îlots de pathogénicité » et constituant une des caractéristiques essentielles de la virulence des salmonelles. Trois îlots ont été décrits à ce jour chez *Salmonella*, appelés SPI pour *Salmonella Pathogenicity Island*. La définition d'îlot de pathogénicité repose sur certains critères d'inclusion, définis par Hacker et al. [67] et repris dans le tableau I. La localisation de ces îlots de pathogénicité sur le chromosome de *Salmonella* Typhimurium est schématisée dans la figure 3.

2.2.1. Invasion des cellules-hôtes épithéliales

2.2.1.1. Les différentes étapes

Les salmonelles semblent induire des signaux variés lors de l'invasion de différents types cellulaires [50].

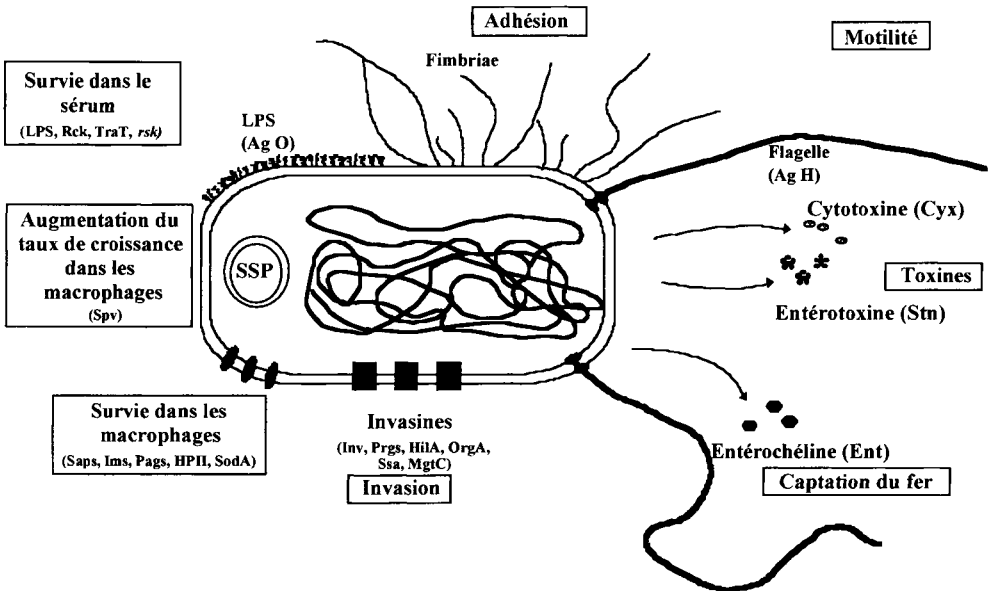


Figure 2. Facteurs de virulence potentiels de *Salmonella* Typhimurium. SSP : plasmide sérotype-spécifique.

Des cellules hôtes viables sont indispensables à l'invasion bactérienne, ce processus requérant de l'énergie. Une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est observée précocément. Il y a participation active des microfilaments de l'hôte lors de l'internalisation des salmonelles dans les cellules eucaryotes. En revanche, les microtubules et les filaments intermédiaires ne sont pas nécessaires à l'internalisation [52]. L'invasion des cellules épithéliales par les salmonelles induit l'agrégation de protéines de surface, au niveau des ondulations membranaires (« macropinosomes »). Ces ondulations membranaires sont dues à la réorganisation des filaments d'actine [52].

Après l'invasion, de l'actine polymérisée, ainsi que de la tropomyosine et de la

tubuline, s'accumulent auprès des vacuoles contenant les bactéries [46]. Les salmonelles mettent 3–4 h pour pénétrer à travers la face apicale et rejoindre par transeycytose le milieu de culture présent juste sous la membrane poreuse. Cependant il n'existe pas de transport spécifique dans ces cellules épithéliales : 90 % des bactéries internalisées demeurent dans les cellules tandis que 8,7 % sortent par la face apicale et seulement 1,3 % par la face basolatérale [42]. Les salmonelles induisent, 4 h après leur contact avec la surface apicale de cellules polarisées, une rupture des jonctions serrées qui s'accompagne d'une perte de résistance électrique et de polarité cellulaire [43].

Tableau I. Caractéristiques des îlots de pathogénicité décrits chez *Salmonella*.

Critère d'inclusion	SPI1	SPI2	SPI3
– Présence de plusieurs gènes de virulence	<i>inv, spa, hil</i>	gènes <i>ssa</i>	<i>mgfC...</i>
– Présence dans les souches pathogènes et absence dans les souches non pathogènes de l'espèce ou d'espèces reliées	présence dans toutes <i>Salmonella</i> spp. absence chez <i>E. coli</i>	présence dans toutes <i>Salmonella</i> spp. sauf <i>S. bongori</i> absence chez <i>E. coli</i>	présence aussi chez <i>Kl. pneumoniae</i> et <i>Y. enterocolitica</i>
–G+C % différent du reste du contenu ADN (52 %)	oui : 40-47 %	oui : 40-47 %	?
–Occupation de grandes régions du chromosome	40 kb	40 kb	17 kb
–Unités génétiques distinctes compactes flanquées de répétitions directes, de séquences répétées	non	non	?
–Présence de gènes de « mobilité »	non pour Typhimurium, IS3 dans certains sérotypes	ARNt ValV	ARNt SelC
– Instabilité	instable dans certains sérotypes	non	?

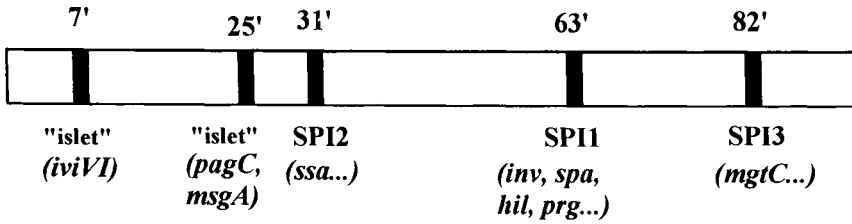


Figure 3. Localisation schématique des îlots de pathogénicité sur le chromosome de *Salmonella*.

2.2.1.2. Les gènes impliqués

L'invasion des cellules épithéliales par ces bactéries est un phénomène complexe sous la dépendance d'un nombre important de gènes, dont beaucoup sont spécifiques de cette phase de la pathogénie.

Le rôle des flagelles semble indubitable puisque le chimiotactisme et la motilité peuvent jouer un rôle dans la pathogénie, en favorisant l'entrée des salmonelles dans les cellules eucaryotes [11]. Ce processus apparaît indispensable à l'expression du pouvoir pathogène de *S. typhi* [60]. La présence de flagelles fonctionnels ou non chez *Salmonella* Typhimurium conditionne la virulence chez la souris, et participe à la survie dans les macrophages murins [20, 128]. La perte de la motilité chez STm réduit les capacités d'invasion et atténue la virulence après inoculation per os pour le poulet [80]. Toutefois, la présence de flagelles fonctionnels n'est pas nécessaire à l'invasion de cellules HEP-2 [40].

Le core et les chaînes latérales O du LPS interviennent eux aussi dans l'entrée des salmonelles dans les cellules épithéliales [93].

Un certain nombre de loci ont été identifiés qui sont spécifiquement impliqués dans les mécanismes d'invasion. Les gènes *inv/spa*, *hilA*, *prgHIJK*, *orgA*, *sspBCDA* et *invA**, *invB** sont situés dans une même région du chromosome de STm. Cette région de 40 kb, située entre 60 et 63 min sur le chromosome de STm et absente de la région correspondante du chromosome de *E. coli* K-12, peut être qualifiée d'îlot de pathogénicité (figure 4). Les gènes de ce cluster ont un pourcentage en bases G et C (GC %) particulièrement bas : 40 à 47 % au lieu de 52 %, et apparaissent comme des gènes xénologues [57]. Ils sont présents dans toutes les sous-espèces de *Salmonella enterica* [13]. Certaines souches isolées de l'environnement peuvent cependant présenter naturellement des délétions importantes dans cet îlot de pathogénicité, contrairement à des souches isolées de cas cliniques [56].



Figure 4. Carte génétique schématique de l'îlot de pathogénicité SPI1 de 40 kb de STm, région 60-63 min du chromosome (d'après [3, 90]).

Rôle du système de sécrétion protéique de type III

Le cluster de 40 kb code pour un système de sécrétion de type III, et des protéines : InvJ et les Ssps (*Salmonella secreted proteins*) ou Sips (*Salmonella invasion proteins*) qui sont impliquées dans le dialogue avec les cellules-hôtes [27, 132]. Les protéines Sips sont exportées à l'intérieur même de la cellule-hôte [28]. De nombreux gènes *inv/spa* ont été identifiés dans cette région du chromosome de STm où Galán et Curtiss [49] ont découvert initialement trois loci impliqués dans l'invasion. Cet ensemble de gènes présente des homologies avec des gènes de virulence caractérisés dans d'autres genres bactériens, pathogènes pour l'homme et l'animal ou phytopathogènes [54] et a reçu la dénomination SPI1. Ces systèmes sont conservés sur le plan fonctionnel chez *Yersinia*, *Salmonella* et *Shigella* [113]. Ce même système a été récemment mis en évidence chez des *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) dans une région de 35 kb du chromosome [76], appelée LEE (locus of enterocyte effacement). Behlau et Miller [9] ont isolé le gène *prgH*, (*PhoP/Q repressed gene*) qui est nécessaire à l'invasion. Les gènes *prgIJK* font partie du système de sécrétion de type III [101] intervenant dans le processus d'invasion.

Les gènes *invABC* semblent jouer un rôle dans la virulence de STm pour le poulet après inoculation orale ainsi que dans la colonisation intestinale, mais non pas dans la virulence après inoculation intrapéritonéale [106]. Des mutants *inv* conservent en outre leur aptitude à envahir les cellules M des plaques de Peyer [26].

Rôle des autres gènes de l'îlot de pathogénicité SPI1

Le locus *hil* (hyper-invasive locus), lié à *prgH*, est situé dans cette même région chromosomique [90]. *HilA* est nécessaire

à la transcription optimale de plusieurs gènes d'invasion et se trouve sous le contrôle de facteurs environnementaux et d'autres facteurs régulateurs [3]. Le gène *iagA* homologue de *hilA* est présent chez *S. typhi* [92]. Le gène *orgA* (oxygen-regulated gene) caractérisé par Jones et Falkow [77] est exprimé dans des conditions limitantes en oxygène [90]. Elsinghorst et al. [36] ont identifié une région de 33 kb située à 58 min sur le chromosome de *S. typhi* avec quatre loci (*inv*ABCD*), distincts des loci *inv* décrits par Galán chez STm, qui confère la capacité d'invasion à une souche de *E. coli*. Ces loci sont en partie présents à 58 min sur le chromosome de STm [90] et d'autres salmonelles de sérotypes pathogènes [37].

Un système de sécrétion protéique analogue, impliqué dans l'invasion, a été décrit chez *Salmonella* Dublin [130]. Stone et al. [116] ont identifié par mutagenèse trois loci *sinABC* (*Salmonella invasion*) chez des mutants de SE déficients pour l'entrée dans les cellules épithéliales.

Un second îlot de pathogénicité de 40 kb, situé à 31 min sur le chromosome de STm et appelé SPI2, a été identifié (*figure 3*), qui code aussi pour un système de sécrétion protéique de type III [114]. Cet îlot de pathogénicité semble intervenir dans l'invasion et la survie intracellulaire des salmonelles (*tableau II*) et est nécessaire à leur virulence pour la souris [97]. Plusieurs gènes ont été identifiés (*spiABR*, *ssaJ/U*) et une interaction entre les deux systèmes de sécrétion de type III de SPI1 et SPI2 a été récemment mise en évidence [74].

2.2.2. Survie dans les macrophages

2.2.2.1. Caractéristiques de la survie intramacrophagique

Les salmonelles, pour la plupart, se comportent comme parasite intracellu-

Tableau II. Localisation et rôle des îlots de pathogénicité de *Salmonella*.

îlot	Localisation	Contrôle par PhoP/Q	Rôle
SPI1	63 min	oui	invasion
SPI2	31 min	non (SsrA/B)	invasion, survie dans les macrophages, maladie systémique
SPI3	82 min	oui	survie dans les macrophages, croissance en milieu carencé en magnésium, virulence pour la souris
petits îlots (islets)			
<i>sifA</i>	27 min	non	formation de structures filamenteuses dans les vacuoles lysosomales des cellules épithéliales infectées
<i>pagC</i>	25 min	oui	survie dans les macrophages
<i>msgA</i>	25 min	non	survie macrophages
<i>iviVI</i>	7 min	oui	?
<i>lpf, pef...</i>	—	—	synthèse de fimbriae et adhésion

laire et sont véhiculées dans l'organisme par les macrophages circulants, puis sont retrouvées dans les macrophages spléniques et hépatiques. Elles résident à l'intérieur de vacuoles qualifiées de phagosomes spacieux. Les salmonelles n'inhibent pas la fusion phagosome-lysosome qui survient rapidement [99] ou est retardée [16]. Cette apparente contradiction pourrait être éclairée par le fait qu'il semble coexister deux populations de salmonelles dans les macrophages [17]. De plus les salmonelles atténuent l'acidification et survivent dans des phagolysosomes acidifiés dans les macrophages [99]. Les phagolysosomes dans lesquels survivent les salmonelles diffèrent des lysosomes classiques, et contiennent de grandes quantités de glycoprotéines de membrane lysosomale (Igp), qui forment des structures filamenteuses dans les cellules épithéliales sous le contrôle d'un gène de *Salmonella* (*sfiA*) [115]. Ces phagosomes contenant les salmonelles ne suivent ainsi pas la voie de dégradation classique dans le macrophage [109].

Les salmonelles sont en outre toxiques pour les macrophages, l'étape d'invasion induisant la mort par apoptose, sous la dépendance de gènes de SPI1 [111]. Ce mécanisme de virulence de STm suggère que la mort des macrophages, suivie par la fuite des salmonelles, constituent aussi des étapes importantes de la pathogénie [85].

2.2.2.2. Gènes impliqués

De nombreux loci sont nécessaires à la survie de *Salmonella* dans les macrophages. La réponse à l'ingestion par les macrophages est complexe et l'expression d'au moins 40 gènes est modifiée [1]. Deux fonctions contribuent de manière importante à la survie dans les macrophages : la résistance aux formes réactives de l'oxygène et la résistance aux défensines, peptides antimicrobiens.

De nombreux gènes sont exprimés en réponse à un stress oxydatif tels que les gènes *oxy*, *katG* (hydroperoxydase I), *katE* (HPII), et *sodA* (superoxyde dismu-

tase) [121]. Des mutants pour ces gènes sont moins aptes que les souches sauvages à survivre dans les macrophages.

Rôle du système de sécrétion protéique de type III

Le locus régulateur *phoP/phoQ* contrôle l'expression de gènes importants pour la résistance aux défensines [59] et participe à la régulation des modifications du lipide A [66]. La désignation ambiguë de ce locus est liée au contrôle par cet opéron de l'expression d'une phosphatase acide, *PhoN*, et de gènes induits par la carence en phosphate, *psiD*. Des gènes contrôlés par *phoP/phoQ* ont été identifiés et rangés en deux groupes : les gènes *pag* (*phoPQ*-activated genes) activés par ce locus, et les gènes *prg* (*phoPQ*-repressed genes) réprimés par ce même locus [89]. Les gènes *pagC* et *pagD* interviennent dans la survie dans les macrophages et dans la virulence pour la souris [65]. *prgH* contribue à l'invasion des macrophages [9], les gènes *prgIJK* faisant partie du système de sécrétion de type III [101]. Les *prgs* sont importants pour la phase d'invasion, et les *pags* activés dans le phagosome acidifié interviennent dans la survie dans les macrophages : l'environnement dans le macrophage stimulerait une commutation (*switch*) de l'expression des *prgs* vers celle des *pags* [89].

L'îlot de pathogénicité SPI2 semble lui aussi impliqué dans la survie des salmonelles dans les macrophages [97], tout comme un troisième îlot de pathogénicité de 17 kb, SPI3 (*figure 3 ; tableaux I et II*), décrit tout récemment [12]. Ce dernier a été découvert en étudiant la région du chromosome de STm homologue du locus *selC* de *E. coli*, espèce dans laquelle des îlots de pathogénicité peuvent être présents et responsables du caractère uropathogène ou entéropatho-

gène des souches. Le contrôle de l'expression de gènes de SPI3 par *phoP/phoQ* peut être souligné.

La survie dans les macrophages semble être une étape-clé et au niveau de laquelle pourrait être recherché le mécanisme de la spécificité d'hôte, la survie intracellulaire étant dépendante de l'hôte [75].

La présence de trois îlots de pathogénicité distincts sur le chromosome de *Salmonella*, probablement acquis par transfert horizontal [58], n'apparaît pas surprenante puisqu'il a été estimé que ce chromosome pouvait héberger au moins cinq îlots de pathogénicité [41]. Leur présence apparaît capitale puisque les fonctions codées par ces îlots sont des fonctions-clés de la pathogénie des infections à salmonelles.

Des gènes spécifiquement induits in vivo ont été identifiés récemment, similaires à des adhésines et invasines, et qui constituent un opéron dans une région du génome de *Salmonella* à bas pourcentage en GC situé à 9 min sur le chromosome [71]. Cet opéron pourrait constituer un quatrième îlot de pathogénicité.

En plus de ces îlots, Groisman et Ochman [58] ont qualifié de « islets » des régions de taille inférieure aux îlots SPI1-SPI3 mais qui présentent des caractéristiques communes comme un pourcentage en G+C différent de celui du chromosome de *Salmonella* (sauf les opérons codant les fimbriae) et donc susceptibles d'avoir été eux aussi acquis par transfert horizontal (*tableau I*).

L'absence de SPI2 des souches de *Salmonella bongori* vient appuyer les hypothèses phylogéniques actuelles [72], cet îlot de pathogénicité ayant vraisemblablement été acquis par transfert horizontal par *S. enterica* après la divergence entre les deux espèces.

2.3. Autres fonctions mises en jeu dans les principales étapes de la pathogénie (figure 2)

2.3.1. Adhésion aux cellules-hôtes épithéliales

L'adhésion des salmonelles aux cellules épithéliales se décompose en deux phases, dont la première est réversible. L'interaction bactérie-cellule hôte induit pendant la première phase la synthèse d'ARN et de protéines bactériennes, indispensables à l'adhésion irréversible et à l'invasion [44].

Les fimbriae contribuent essentiellement à la première phase de l'adhésion des bactéries à la surface des cellules épithéliales de l'hôte. Ce sont des appendices flexibles ou rigides (figure 2), également appelés pili, exprimés à la surface de nombreuses espèces bactériennes, généralement composés par polymérisation d'une sous-unité protéique majeure (fimbriiline ou piline) et de sous-unités mineures liées par des forces non covalentes. Une même bactérie peut exprimer simultanément plusieurs types de fimbriae [7].

Le rôle des fimbriae dans l'infection est controversé. Un certain nombre d'études in vitro ont montré que les fimbriae interviennent dans l'adhésion des salmonelles à un grand nombre de lignées cellulaires aviaires ou de mammifères et contribuent à l'invasion de ces cellules [30]. L'adhésion de certains fimbriae à des protéines de la matrice tissulaire a été également décrite [79]. Cependant l'adhésion par des fimbriae à des lignées cellulaires in vitro ne reflète pas forcément l'infectivité in vivo chez la souris.

Peu d'études ont été entreprises in vivo pour élucider le rôle de ces organelles. Des travaux préliminaires de Duguid et al. en 1976 [34] ont décrit des différences d'infectivité, d'excrétion fécale et de

pathogénicité pour la souris, liées aux fimbriae de type 1 de STm. La présence de fimbriae *lpf* semble indispensable à l'expression de la typhoïde murine [8]. Une implication des fimbriae de type 1, et peut-être de type 3, de SE dans l'adhésion et la pathogénie chez la souris a été suggérée [2]. En revanche, les SEF14 ne jouent pas un rôle déterminant dans la virulence pour la souris [120] alors même que des anticorps dirigés contre les SEF14 de SE ont apporté une protection partielle de la souris contre l'infection par SE [102]. Le rôle joué dans la colonisation et la persistance par SefA, la sous-unité majeure de ces fimbriae, dépend des souches [98].

2.3.2. Survie dans le sérum

Les chaînes polysaccharidiques portant l'antigène O contribuent à la résistance au pouvoir bactéricide du sérum dû à l'activité du complément. Une protéine de membrane externe, Rck (*resistance to complement killing*) codée par un gène plasmidique du plasmide sérotype-spécifique ou SSP, est également impliquée [70]. Rck, qui joue aussi un rôle dans l'invasion des cellules eucaryotes [24], présente des homologues génétiques et fonctionnelles avec Ail, une invasine de *Yersinia*, et avec PagC [69].

2.3.3. Rôle du plasmide de virulence

Les souches de *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum-Pullorum* et *S. Abortusovis*, STm, SE hébergent de grands plasmides spécifiques de sérotype (50 à 90 kb). La perte du plasmide (SSP) réduit la capacité de la bactérie à provoquer une infection systémique chez la souris. Une région de 8 kb est suffisante pour restaurer la capacité de souches de STm, SE, *S. Dublin* et *S. Choleraesuis* à provoquer une telle infection. Cette région retrouvée dans tous les SSPs [64] contient cinq gènes : *spvR* et l'opéron

spvABCD. *spvR* est un gène régulateur, contrôlé lui-même par *RpoS*, facteur sigma alternatif situé sur le chromosome. *spvR* régule l'expression de *spvABCD* [22]. La fonction des gènes *spvABCD* nest pour le moment pas élucidée. Le plasmide na aucun effet sur l'invasion de cellules en culture et il nest pas nécessaire à l'invasion des organes profonds. En revanche, il augmente le taux de croissance des salmonelles dans le foie et la rate [63]. Notons que *RpoS* est un facteur de transcription nécessaire à l'expression d'un grand nombre de gènes induits en phase stationnaire, et constitue également un facteur de virulence chez STm, certaines souches de STm se révélant avirulentes en raison d'un gène *rpoS* déficient [117].

Une corrélation entre présence du SSP chez des souches de STm et bactériémie chez l'homme a été relevée [38]. Les plasmides de *S. Dublin* et de *S. Choleraesuis* jouent un rôle dans les formes septicémiques chez les veaux et les porcelets, respectivement [31, 126]. Les gènes *spv* du SSP de *S. Dublin* sont indispensables au développement d'une entérite sévère ou d'une forme septicémique chez l'hôte naturel bovin [81]. Chez les volailles, le plasmide SSP présent chez *S. Gallinarum* et chez son variant *S. Pullorum* joue un rôle dans la virulence pour le poulet [4].

En revanche, les SSPs de STm et SE ne jouent aucun rôle dans la virulence de ces deux sérotypes pour le poulet, une augmentation paradoxale du pouvoir pathogène après inoculation orale à des poussins étant même observée avec STm ou SE curée de son plasmide [68]. La présence de SSPs dans d'autres sérotypes na pas été non plus corrélée avec la virulence pour le poulet [105].

2.3.4. Système de captation du fer

Certaines salmonelles sont capables de synthétiser l'entérochéline, ou entérobac-

tine, un sidérophore de la famille des phénolates sécrété dans des conditions limitantes en fer, telles que celles rencontrées dans l'organisme hôte. La corrélation entre la capacité à produire l'entérochéline et la pathogénicité des salmonelles a été peu étudiée. Toutefois le système entérochéline semble jouer un rôle dans la fièvre typhoïde [47] et un mutant de STm déficient pour la synthèse de l'entérochéline a présenté une virulence diminuée chez la souris après injection intrapéritonéale [131]. Benjamin et al. [10] ont montré que ce sidérophore favorise la croissance dans le sérum murin mais nest pas indispensable à la virulence pour la souris. La localisation intracellulaire de *Salmonella* permettrait à la bactérie de conserver sa virulence en l'absence de sidérophore.

Le système entérochéline est contrôlé par le régulon Fur (*ferric uptake regulator*) répondant à la carence en fer, lequel contrôle au moins 14 gènes chez STm [122]. Certains de ces gènes sont impliqués dans la réponse adaptative à l'acide ou ATR (acid tolerance response), laquelle joue un rôle dans la virulence [51].

2.3.5. Rôle des toxines

Différents produits de la bactérie dont les toxines sont responsables de lésions ou symptômes observés chez l'hôte.

Endotoxine (lipide A du LPS)

Le LPS est constitué par le lipide A, le core oligosaccharidique et des chaînes latérales O. La toxicité du LPS est portée par le lipide A, ancré dans la membrane externe. Ses effets sont liés à l'activation de phénomènes inflammatoires importants [33]. L'endotoxine est ainsi responsable de la plupart des symptômes de la fièvre typhoïde et du choc septicémique consécutif à une bactériémie [33].

Entérotoxines

Les entérotoxines jouent probablement un rôle dans les diarrhées des formes gastro-entériques [39].

Une entérotoxine de *Salmonella* Typhimurium, de 29 kDa [21], reliée sur les plans immunologique et génétique à la toxine cholérique (CT-like), thermolabile de type II, est active sur des anses iléales ligaturées de lapin [107]. Elle est codée par *stn* localisé sur le chromosome [23]. Une autre entérotoxine, de 100 kDa, thermolabile et non CT-like, active sur cellules CHO et sur anses iléales ligaturées de lapin a été décrite chez STm par Rahman et al. [108].

Autres toxines

Une cytotoxine de 26 kDa codée par *cyc* [83] isolée de STm s'est révélée toxique pour de nombreuses lignées cellulaires. Une autre cytotoxine de 32 kDa [78] active sur des macrophages a été isolée d'une souche de STm. Une cytolysine de STm codée par *slyA* (salmolysine [82]) favorise la survie dans les macrophages murins péritonéaux et est impliquée dans la virulence pour la souris. C'est une toxine de la famille RTX, cytolysines des bactéries Gram négatives provoquant la formation de pores dans la membrane plasmique. Récemment, son rôle dans la destruction des cellules M et la survie intracellulaire a été démontré [32].

2.4. Gènes de l'hôte affectant la sensibilité à l'infection

La résistance génétique aux infections à salmonelles a été décrite et particulièrement étudiée chez la souris. Plusieurs loci ont été caractérisés. L'un d'entre eux, *ity* (ou *bcg* ou *lsh* ; [125]), accroît la résistance aux infections par des parasites intracellulaires tels que *Mycobacterium*, *Leishmania* et *Salmonella*. Deux autres loci, *lps* et *xid*, sont exprimés comme *ity* dans des cellules immunitaires. La résis-

tance génétique a été également explorée chez différentes lignées de volailles [18, 61]. Elle est liée probablement à la présence d'un gène autosomal dominant de résistance *ity*-like [18].

3. MODÈLES D'ÉTUDE DE LA PATHOGÉNICITÉ DES SALMONELLES

Les modèles d'étude de la pathogénicité des bactéries permettent d'analyser, finement ou globalement, l'évolution de l'infection chez un hôte ou un aspect du processus infectieux.

Les connaissances acquises à partir d'études sur l'animal ou sur cellules sont précieuses pour mieux comprendre la pathogénie, et peuvent ensuite déboucher sur des stratégies de lutte contre ces infections, dont la vaccination. De nombreux travaux en cours s'intéressent au parasitisme intracellulaire de *Salmonella* et mettent en évidence de nombreux gènes impliqués dans ce mécanisme.

L'analyse des interactions hôte-pathogène est en général focalisée sur un aspect particulier de la pathogénie. Or, la pathogénie de ces infections à *Salmonella* apparaît complexe, avec de nombreux gènes impliqués et de nombreuses fonctions intervenant dans la virulence. L'identification de ces gènes/fonctions peut reposer sur plusieurs stratégies, avec validation de leur rôle dans des modèles d'étude développés in vivo et in vitro.

3.1. Identification de gènes impliqués dans la virulence

3.1.1. Stratégies utilisées

Plusieurs stratégies ont été développées pour identifier des gènes impliqués dans la virulence, appliquant une version moléculaire du postulat de Koch [62].

1. Il existe une relation entre un phénotype, ou une fonction, et la pathogénicité.

2. Une mutation doit être construite dans le gène codant la fonction, avec obtention d'un mutant isogénique ne possédant plus la fonction.

3. Le mutant isogénique doit être atténué pour la virulence dans un modèle approprié.

4. La mutation doit être complétée en trans par l'allèle sauvage.

Une stratégie couramment utilisée consiste à obtenir des mutants de manière aléatoire, puis à identifier par un test adéquat les mutants dont la virulence est modifiée. L'obtention de mutants repose en général sur l'utilisation de transposons. Pour faciliter leur utilisation, certains transposons disposent d'éléments de criblage (gène *phoA* ou résistance à un antibiotique). Une mutation par moyens chimiques ou physiques (UV) peut être envisagée [96]. Un gène d'intérêt peut être également recherché par mise en évidence de sa fonction après constitution d'une banque génomique [83] ou par recherche dans un organisme non pathogène d'une fonction portée par un plasmide (résistance au sérum ; [110]).

Le criblage peut être réalisé par inoculation à des animaux [9], ou bien sur culture de cellules [15], ou encore par des tests phénotypiques appropriés [59]. Il est donc essentiel de disposer d'un modèle suffisamment puissant pour déceler l'absence ou la présence d'une fonction associée à la virulence, chez un grand nombre de mutants. Après identification de tels gènes, leur fonction peut être précisée par des tests de complémentation avec un plasmide sur un organisme non pathogène tel que *E. coli* HB101 [36, 83, 110] ou sur des mutants défectifs pour la fonction étudiée [49, 116], ou bien par la création de mutations plus précises par échange allélique [121].

On peut envisager de rechercher par hybridation ou PCR des gènes connus pour être impliqués dans la virulence dans des genres différents, et d'analyser ensuite la fonction sur cellules et le rôle dans la virulence pour les animaux [107].

Récemment, la recherche de gènes insérés dans un site cible commun avec une espèce voisine, en l'occurrence le locus *selC* d'*E. coli*, a permis la découverte de l'ilot SPI3 [12].

3.1.2. Recherche de gènes exprimés *in vivo*

La première méthode décrite a été la technique IVET, (*In Vivo Expression Technology*) [86]. Elle consiste à rechercher des gènes exprimés spécifiquement *in vivo* par fusion du chromosome bactérien avec un vecteur suicide contenant les gènes *purA* et *lacZ* fonctionnels mais sans promoteur : elle permet la recherche de promoteurs induits sélectivement *in vivo* et non induits *in vitro*. Le gène *purA* est indispensable à la survie de la bactérie dans l'hôte : si la fusion s'est effectuée près d'un gène induit spécifiquement *in vivo*, la salmonelle pourra se développer et sera retrouvée dans la rate. Pour les bactéries retrouvées dans la rate, le produit du gène *lacZ* est recherché *in vitro* : son absence caractérise la spécificité de l'induction *in vivo*, le promoteur pouvant contrôler un gène de virulence.

Des techniques dérivées ont été ensuite proposées, reprenant ce principe, avec un vecteur de fusion transcriptionnelle *cat-lacZY* sans promoteur et des souris traitées au chloramphénicol : l'expression de *cat* est indispensable *in vivo* et l'absence d'induction de *lacZY* *in vitro* est ensuite recherchée [87]. Une démarche voisine a été proposée par Camilli et Mekalanos en 1995 [19] : le gène *tet* est placé entre des séquences résolvasse sur le chromosome ; le vecteur suicide porte le gène de la recombinase et

lacZY, fonctionnels mais sans promoteur. Les bactéries inoculées à l'animal doivent avoir une insertion de l'ensemble recombinase-*lacZY* en aval d'un promoteur inactif uniquement *in vitro* ; dans ces conditions, le gène *tet* demeure présent sur le chromosome et les souches sont Lac- Tet^R. Lors du passage *in vivo*, si le promoteur est induit, le système recombinase-résolvase entraîne l'excision de *tet*. Des souches TetS sont alors recherchées parmi celles isolées chez l'animal.

Une technique voisine de la technique IVET a été récemment développée : elle permet la mise en évidence de gènes exprimés spécifiquement *in vitro* dans certains tissus. Cette méthode d'induction différentielle de la fluorescence (ou DFI pour *Differential Fluorescence Induction*) permet comme IVET la recherche de promoteurs avec la protéine GFP : des bactéries exprimant la GFP dans les macrophages mais non à l'extérieur des cellules hôtes ont permis d'identifier des gènes appelés *mig* (pour *macrophage-induced genes*) [124]. Quatre d'entre eux codaient pour des facteurs de virulence, dont l'un était partie intégrante de SPI2.

Une autre technique élégante de recherche de gènes spécifiquement exprimés *in vivo*, par «sélection négative», a été décrite : il s'agit de mutagenèse insertionnelle avec des transposons portant des séquences uniques d'ADN («DNA-tags» ou étiquettes d'ADN) sur un vecteur suicide [73]. Les étiquettes d'une population de mutants, représentant l'inoculum bactérien ou les bactéries récupérées dans l'hôte infecté, sont détectés par amplification, marquage radioactif et hybridation. Les colonies hybridant avec le produit d'amplification de l'inoculum mais non avec celui des bactéries récupérées dans l'hôte représentent des mutants avec une virulence atténuée.

L'analyse en temps réel de la progression d'une infection de souris a été décrite avec des salmonelles hébergeant un plas-

mide exprimant constitutivement la luciférase [29].

3.2. Modèles d'étude *in vivo*

Les modèles animaux sont onéreux et malaisés à utiliser. Cependant leur utilisation est indispensable pour rechercher les organes cibles, pour tester le rôle d'un facteur de virulence pour l'espèce animale considérée, ou pour mettre au point des stratégies vaccinales efficaces. Dans le cas particulier de l'espèce humaine, ils sont un préalable indispensable au développement de vaccins. Ainsi les connaissances acquises dans le modèle de la typhoïde murine à STM, mimant la typhoïde humaine à *S. typhi*, autorisent des extrapolations à l'homme. Ces modèles sont également indispensables à la validation d'études effectuées *in vitro*.

Modèle souris

Le modèle d'étude de la typhoïde humaine est la typhoïde murine à STM. Largement utilisé, il a permis de montrer l'importance des gènes de virulence plasmidiques *spv* [63], et des gènes chromosomiques *inv* intervenant dans l'invasion [49] ou du gène *pagC* favorisant la survie en macrophages [65]. Il a été également utilisé pour l'étude de la spécificité d'hôte [100].

Modèles volaille

Différents modèles ont été développés pour étudier la virulence de souches de salmonelles pour le poulet [18, 53], la poule pondeuse [6, 84] ou le canard [14].

Ces études ont permis de préciser la pathogénie de l'infection des volailles par les salmonelles [6], de comparer la virulence de différentes souches de salmonelles [53, 104], d'étudier la spécificité d'hôte [5] et la résistance génétique aux salmonelles chez les volailles [61, 84].

Autres modèles

Les études sur l'évolution de l'infection par *Salmonella* ont été initiées par Takeuchi dès 1967 sur anses intestinales de cochons d'Inde anesthésiés [118]. Les observations en microscopie électronique ont été confirmées depuis par de nombreuses études menées sur modèles cellulaires polarisés.

Chez les volailles, des études en microscopie électronique avec SE dans l'intestin de poussins anesthésiés [123] ont donné des résultats équivalents à ceux de l'étude de Takeuchi. Un modèle voisin a permis d'étudier l'invasion de la lamina propria chez le poulet par SE et *S. Thompson* [103].

Le même modèle a été utilisé chez le veau [127], la souris [80], conduisant aux mêmes observations.

Le modèle RILT (*rabbit ileal loops test*) a été employé pour mettre en évidence l'activité d'une entérotoxine [107].

L'adhésion de souches de salmonelles a été étudiée sur muqueuse intestinale de poulet [30]. Un modèle complexe a été développé pour étudier l'invasion de cellules hépatiques par STM et *S. Choleraesuis* chez le rat [95].

3.3. Modèles d'étude in vitro

Différents tests in vitro ont été développés comme méthodes alternatives pour l'étude de facteurs de virulence de souches bactériennes. Ces méthodes sont plus souples d'utilisation et autorisent une relative standardisation.

3.3.1. Monocouches semi-confluentes de cellules épithéliales

Le modèle in vitro le plus répandu d'étude de bactéries entéropathogènes utilise des monocouches semi-confluentes de cellules épithéliales. L'invasion bactérienne est quantifiée par un test à la gen-

tamicine, qui élimine les bactéries extracellulaires. Les bactéries intracellulaires viables sont ensuite dénombrées pour déterminer l'efficacité de l'invasion, souvent exprimée en pourcentage de l'inoculum bactérien initial [119]. De nombreuses lignées cellulaires ont été employées : cellules HeLa, HEp-2, Henle407, A431, Vero.

Dans une méthode quantitative originale décrite par Niesel et al. [94], des cellules HeLa en monocouche sont recouvertes d'agarose, mais cette technique nécessite l'ajustement du rapport bactéries infectantes/cellules au pouvoir invasif de la souche de salmonelles ou de shigelles.

Les tests d'invasion peuvent permettre l'exploration fine de mécanismes impliqués : la fonction du cytosquelette [46, 52, 91] ou l'induction des voies de communication de la cellule hôte [80, 119].

3.3.2. Monocouches épithéliales polarisées

Quelques lignées cellulaires épithéliales peuvent être cultivées sur des membranes poreuses formant alors des monocouches épithéliales polarisées. L'avantage de tels systèmes est de disposer de structures de bordure en brosse.

La lignée Madin-Darby *canine kidney* (MDCK) et trois lignées cellulaires humaines adénocarcinomeuses, Caco-2, HT-29 et T84 ont été utilisées dans un tel système [119]. Les monocouches ont des jonctions serrées fonctionnelles et sont imperméables aux ions. La mesure de la résistance électrique transépithéliale permet d'évaluer l'intégrité de l'épithélium [43].

L'adhésion des bactéries aux surfaces apicale et basolatérale, l'invasion, et la pénétration au travers de la monocouche peuvent être mesurées, par exemple avec des bactéries marquées par un radioisotope [45].

La pénétration des bactéries au travers de la monocouche, appelée transcytose, peut être quantifiée, en prélevant à différents moments des échantillons du milieu opposé à celui où les bactéries ont été ajoutées [43]. Là aussi des microorganismes marqués peuvent être utilisés, avec mesure de la radioactivité présente dans les deux milieux (apical et basolatéral), ainsi que dans la monocouche épithéliale [42].

Les modèles cellulaires polarisés sont relativement proches des surfaces épithéliales avec lesquelles les bactéries interagissent chez l'hôte. Ces modèles ont ainsi permis de montrer que la présence de structures glycoprotéiques à la surface des cellules épithéliales est nécessaire à l'induction de fonctions bactériennes spécifiques, indispensables au processus d'invasion [42]. Des observations de telles structures ont été effectuées en microscopie électronique [52, 91].

L'addition de cellules motiles immunitaires (comme les PMN : polynucléaires) à de tels systèmes permet de mimer encore mieux des conditions physiologiques rencontrées *in vivo*. Ceci permet par exemple l'analyse des signaux bactériens responsables de la transmigration des PMN avec STm [88].

3.3.3. *Macrophages en culture*

L'étude des gènes contribuant à la survie et à la croissance dans un environnement intracellulaire peut utiliser des cultures de macrophages. Des macrophages de souris, isolés de la moelle osseuse, de la rate ou d'un liquide d'ascite [15, 112] ont été utilisés ainsi que plusieurs lignées de macrophages murines et/ou aviaires comme J774, U937 et C3H/HeJ [1, 48, 78].

Le rôle potentiel de l'acidification endosomale dans les macrophages peut être recherché en utilisant des ionophores cationiques, des agents lysosomotropes ou des lignées cellulaires CHO (*chinese*

hamster ovary) mutantes pour inhiber l'acidification endosomale des cellules cultivées.

La survie ou la multiplication intracellulaire dans les macrophages peuvent être évaluées dans un modèle d'invasion proche de celui décrit pour les cellules épithéliales. Le taux de croissance bactérienne intracellulaire dans les macrophages est variable, mais STm peut se multiplier dans des macrophages d'origines très différentes [15].

Enfin des modèles particuliers ont été adaptés par exemple à l'étude de l'induction de la réponse immunitaire spécifique avec utilisation d'hybridomes T [129], ou bien à la recherche de toxines : recherche de la toxicité pour cellules CHO, A431, HeLa, MDCK [83], et mesure de la concentration de l'AMPc [21].

4. CONCLUSION

L'arsenal de facteurs de virulence dont dispose *Salmonella* apparaît remarquable, et permet d'expliquer en partie son adaptation à de nombreuses situations, et pour *Salmonella* Typhimurium, à de nombreux hôtes. Le système de sécrétion protéique de type III découvert chez *Salmonella* et d'autres espèces bactériennes pathogènes pour les plantes ou les animaux, a probablement évolué à partir de systèmes d'assemblage flagellaire. Il apparaît impliqué dans deux étapes clés de la pathogénie : l'invasion des cellules épithéliales et la survie dans les macrophages. À ce jour, deux systèmes au moins ont été identifiés, présents dans des zones déterminées du chromosome et constituant des îlots de pathogénicité. L'acquisition de tels îlots de pathogénicité semble avoir eu lieu par transfert horizontal, à partir d'autres bactéries. Il semble en outre probable que le chromosome de *Salmonella* en héberge d'autres.

Le contrôle de l'expression des gènes intervenant dans la virulence est très complexe, avec activation en cascade, en réponse aux conditions environnementales. La vie d'un pathogène adapté peut alors être visualisé comme une série d'étapes d'activation de gènes en réponse à un ensemble complexe de conditions environnementales simultanées [41].

Le second îlot de pathogénicité a été découvert récemment au moyen de techniques classiques, exploitant les transposons. De nouvelles approches, comme la technologie IVET, la méthode DFI ou la technique de sélection négative, ont également permis l'identification de facteurs de virulence et ouvrent des perspectives pour la découverte spécifique de gènes impliqués dans la virulence *in vivo*.

REMERCIEMENTS

Cet article est issu d'une thèse de l'Université Claude-Bernard Lyon I n°185-96 sous la direction d'Élisabeth Chalus-Dancla. Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Élisabeth Chalus-Dancla (Laboratoire d'écopathologie microbienne, station de pathologie aviaire et parasitologie, Inra de Tours-Nouzilly) pour son accueil chaleureux dans son laboratoire, ses encouragements et les nombreuses corrections apportées aux différents manuscrits.

RÉFÉRENCES

- [1] Abshire K.Z., Neidhardt F.C., Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 3734–3743.
- [2] Aslanzadeh J., Paulissen L.J., Adherence and pathogenesis of *Salmonella enteritidis* in mice, *Microbiol. Immunol.* 34 (1990) 885–893.
- [3] Bajaj V., Lucas R.L., Hwang C., Lee C.A., Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of
- hilA expression, *Mol. Microbiol.* 22 (1996) 703–714.
- [4] Barrow P.A., Lovell M.A., The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella pullorum*, *J. Gen. Microbiol.* 134 (1988) 2307–2316.
- [5] Barrow P.A., Huggins M.B., Lovell M.A., Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system, *Infect. Immun.* 62 (1994), 4602–4610.
- [6] Baskerville A., Humphrey T.J., Fitzgeorge R.B., Cook R.W., Chart H., Rowe B., Whitehead A., Airborne infection of laying hens with *Salmonella enteritidis* phage type 4, *Vet. Rec.* 130 (1992) 395–398.
- [7] Bäumler A.J., Heffron F., Identification and sequence analysis of IpfABCDE, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 2087–2097.
- [8] Bäumler A.J., Tsolis R.M., Valentine P.J., Ficht T.A., Heffron F., Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid, *Infect. Immun.* 65 (1997) 2254–2259.
- [9] Behlau I., Miller S.I., A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 4475–4484.
- [10] Benjamin W.H., Turnbough C.L., Posey B.S., Briles D.E., The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid, *Infect. Immun.* 50 (1985) 392–397.
- [11] Betts J., Finlay B.B., Identification of *Salmonella typhimurium* invasiveness loci, *Can. J. Microbiol.* 38 (1992) 852–857.
- [12] Blanc-Potard A.B., Groisman E.A., The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival, *EMBO J.* 16 (1997) 5376–5385.
- [13] Boyd E.F., Li J., Ochman H., Selander R.K., Comparative genetics of the *inv-spa* invasion gene complex of *Salmonella enterica*, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1985–1991.
- [14] Buchholz P.S., Fairbrother A., Pathogenicity of *Salmonella pullorum* in northern bobwhite quail and mallard ducks, *Avian Dis.* 36 (1992) 304–312.
- [15] Buchmeier N.A., Heffron F., Intracellular survival of wild-type *Salmonella typhimurium* and macrophage-sensitive mutants in diverse populations of macrophages, *Infect. Immun.* 57 (1989) 17.
- [16] Buchmeier N.A., Heffron F., Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*, *Infect. Immun.* 59 (1991) 2232–2238.
- [17] Buchmeier N.A., Libby S.J., Dynamics of growth and death within a *Salmonella typhi-*

- murium* population during infection of macrophages. *Can. J. Microbiol.* 43 (1997) 29–34.
- [18] Bumstead N., Barrow P.A., Genetics of resistance to *Salmonella typhimurium* in newly hatched chicks. *Br. Poult. Sci.* 29 (1988) 521–529.
- [19] Camilli A., Mekalanos J.J., Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Mol. Microbiol.* 18 (1995) 671–683.
- [20] Carsiotis M., Weinstein D.L., Karch H., Holder I.A., O'Brien A.D., Flagella of *Salmonella typhimurium* are a virulence factor in infected C57BL/6J mice. *Infect. Immun.* 46 (1984) 814–818.
- [21] Chary P., Prasad R., Chopra A.K., Peterson J.W., Location of the enterotoxin gene from *Salmonella typhimurium* and characterization of the gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* 111 (1993) 87–92.
- [22] Chen C.Y., Buchmeier N.A., Libby S., Fang F.C., Krause M., Guiney D.G., Central regulatory role for the RpoS sigma factor in expression of *Salmonella dublin* plasmid virulence genes. *J. Bacteriol.* 177 (1995) 5303–5309.
- [23] Chopra A.K., Peterson J.W., Chary P., Prasad R., Molecular characterization of an enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *Microb. Pathog.* 16 (1994) 85–98.
- [24] Cirillo D.M., Heffernan E.J., Wu L., Harwood J., Fierer J., Guiney D.G., Identification of a domain in Rek, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect. Immun.* 64 (1996) 2019–2023.
- [25] Clark M.A., Jepson M.A., Simmons N.L., Hirst B.H., Preferential interaction of *Salmonella typhimurium* with mouse Peyer's patch M cells. *Res. Microbiol.* 145 (1994) 543–552.
- [26] Clark M.A., Reed K.A., Lodge J., Stephen J., Hirst B.H., Jepson M.A., Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella typhimurium* inv mutants severely deficient for invasion of cultured cells. *Infect. Immun.* 64 (1996) 4363–4368.
- [27] Collazo C.M., Galán J.E., Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 64 (1996) 3524–3531.
- [28] Collazo C.M., Galán J.E., The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol. Microbiol.* 24 (1997) 747–756.
- [29] Contag C.H., Contag P.R., Mullins J.I., Spilman S.D., Stevenson D.K., Benaron D.A., Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Mol. Microbiol.* 18 (1995) 593–603.
- [30] Craven S.E., Cox N.A., Bailey J.S., Blankenship L.C., Binding of *Salmonella* strains to immobilized intestinal mucosal preparations from broiler chickens. *Avian Dis.* 36 (1992) 296–303.
- [31] Danbara H., Moriguchi R., Suzuki S., Tamura Y., Kijima M., Oishi K., Matsui H., Abe A., Nakamura M., Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis* RF-1 strains on pig septicemia. *J. Vet. Med. Sci.* 54 (1992) 1175–1178.
- [32] Daniels J.J.D., Autenrieth I.B., Ludwig A., Goebel W., The gene slyA of *Salmonella typhimurium* is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infect. Immun.* 64 (1996) 5075–5084.
- [33] Danner R.L., Natanson C., Endotoxin : a mediator of and potential therapeutic target for septic shock, in: Moss J., Iglewski B., Vaughan M., Tu A.T. (Eds.) *Bacterial toxins and virulence factors in disease*, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 589–614.
- [34] Duguid J.P., Darekar M.R., Wheaton D.W.F., Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *J. Med. Microbiol.* 9 (1976) 459–473.
- [35] Dunlap N.E., Benjamin Jr W.H., Berry A.K., Eldridge J.H., Briles D.E., A safe-site for *Salmonella typhimurium* is within splenic polymorphonuclear cells. *Microb. Pathog.* 13 (1992) 181–190.
- [36] Elsinghorst E.A., Baron L.S., Kopecko D.J., Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5173–5177.
- [37] Falkow S., Isberg R.R., Portnoy D.A., The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8 (1992) 333–363.
- [38] Fierer J., Krause M., Tauxe R., Guiney D., *Salmonella typhimurium* bacteremia: association with the virulence plasmid. *J. Infect. Dis.* 166 (1992) 639–642.
- [39] Finlay B.B., Falkow S., Virulence factors associated with *Salmonella* species. *Microbiol. Sci.* 5 (1988) 324–328.
- [40] Finlay B.B., Falkow S., *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol. Microbiol.* 3 (1989) 1833–1841.
- [41] Finlay B.B., Falkow S., Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 136–169.
- [42] Finlay B.B., Fry J., Rock E.P., Falkow S., Passage of *Salmonella* through polarized epithelial cells: role of the host and bacterium. *J. Cell Sci.* 11 (suppl.) (1989) 99–107.

- [43] Finlay B.B., Gumbiner B., Falkow S. Penetration of *Salmonella* through a polarized madin-darby canine kidney epithelial cell monolayer. *J. Cell Biol.* 107 (1988) 221–230.
- [44] Finlay B.B., Heffron F., Falkow S. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 243 (1989) 940–943.
- [45] Finlay B.B., Starnbach M.N., Francis C.L., Stocker B.A.D., Chatfield S., Dougan G., Falkow S. Identification and characterization of *TnphoA* mutants of *Salmonella* that are unable to pass through a polarized MDCK epithelial cell monolayer. *Mol. Microbiol.* 2 (1988) 757–766.
- [46] Finlay B.B., Ruschkowski S., Dedhar S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* 99 (1991) 283–296.
- [47] Furman M., Fica A., Saxena M., Di Fabio J.L., Cabello F.C. *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice. *Infect. Immun.* 62 (1994) 4091–4094.
- [48] Gahring L.C., Heffron F., Finlay B.B., Falkow S. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect. Immun.* 58 (1990) 443–448.
- [49] Galán J.E., Curtiss R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 6383–6387.
- [50] Galán, J.E., Ginocchio C. The molecular genetic bases of *Salmonella* entry into mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994) 301–306.
- [51] Garcia-del Portillo F., Foster J.W., Finlay B.B. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect. Immun.* 61 (1993) 4489–4492.
- [52] Garcia-del Portillo F., Pucciarelli M.G., Jefferies W.A., Finlay B.B. *Salmonella typhimurium* induces selective aggregation and internalization of host cell surface proteins during invasion of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 107 (1994) 2005–2020.
- [53] Gast R.K., Benson S.T. The comparative virulence for chicks of *Salmonella enteritidis* phage type 4 isolates and isolates of phage types commonly found in poultry in the United States. *Avian Dis.* 39 (1995) 567–574.
- [54] van Gijsegem F., Genin S., Boucher C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* 1 (1993) 175–180.
- [55] Ginocchio C.C., Olmsted S.B., Wells C.L., Galán J.E. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* 76 (1994) 717–724.
- [56] Ginocchio C.C., Rahn K., Clarke R.C., Galán J.E. Naturally occurring deletions in the centisome 63 pathogenicity island of environmental isolates of *Salmonella* spp. *Infect. Immun.* 65 (1997) 1267–1272.
- [57] Groisman E.A., Ochman H. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J.* 12 (1993) 3779–3797.
- [58] Groisman E.A., Ochman H. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol.* 5 (1997) 343–349.
- [59] Groisman E.A., Parra-Lopez C., Salcedo M., Lipps C.J., Heffron F. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 11939–11943.
- [60] Grossman D.A., Witham N.D., Burr D.H., Lesmana M., Rubin F.A., Schoolnik G.K., Parsonnet J. Flagellar serotypes of *Salmonella typhi* in Indonesia: relationships among motility, invasiveness, and clinical illness. *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 212–216.
- [61] Guillot J.F., Beaumont C., Bellatif F., Mouline C., Lantier F., Colin P., Protais J. Comparison of resistance of various poultry lines to infection by *Salmonella enteritidis*. *Vet. Res.* 26 (1995) 81–86.
- [62] Gulig P.A. Use of isogenic mutants to study bacterial virulence factors. *J. Microbiol. Methods* 18 (1993) 275–287.
- [63] Gulig P.A., Doyle T.J. The *Salmonella typhimurium* plasmid increases the growth rate of salmonellae in mice. *Infect. Immun.* 61 (1993) 504–511.
- [64] Gulig P.A., Danbara H., Guiney D.G., Lax A.J., Norel F., Rhen M. Molecular analysis of spv virulence genes of the salmonella virulence plasmids. *Mol. Microbiol.* 7 (1993) 825–830.
- [65] Gunn J.S., Alpuche-Aranda C.M., Loomis W.P., Belden W.J., Miller S.I. Characterization of the *Salmonella typhimurium* pagC/pagD chromosomal region. *J. Bacteriol.* 177 (1995) 5040–5047.
- [66] Guo L., Lim K.B., Gunn J.S., Bainbridge B., Darveau R.P., Hackett M., Miller S.I. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* 276 (1997) 250–253.
- [67] Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., Tschäpe H. Pathogenicity islands of cirulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23 (1997) 1089–1097.
- [68] Halavatkar H., Barrow P.A. The role of a 54-kb plasmid in the virulence of strains of *Salmonella Enteritidis* of phage type 4 for chickens and mice. *J. Med. Microbiol.* 38 (1993) 171–176.

- [69] Heffernan E.J., Harwood J., Fierer J., Guiney D., 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 (1992) 84–91.
- [70] Heffernan E.J., Wu L., Louie J., Okamoto S., Fierer J., Guiney D., 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 (1994) 5183–5186.
- [71] Heithoff D.M., Conner C.P., Hanna P.C., Julio S.M., Hentschel U., Mahan M.J., Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 934–939.
- [72] Hensel M., Shea J.E., Bäumler A.J., Gleeson C., Blattner F., Holden D.W., Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 1105–1111.
- [73] Hensel M., Shea J.E., Gleeson C., Jones M.D., Dalton E., Holden D.W., Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection, *Science* 269 (1995) 400–403.
- [74] Hensel M., Shea J.E., Raupach B., Monack D., Falkow S., Gleeson C., Kubo T., Holden D.W., Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2, *Mol. Microbiol.* 24 (1997) 155–167.
- [75] Ishibashi Y., Arai T., A possible mechanism for host-specific pathogenesis of *Salmonella* serovars, *Microb. Pathog.* 21 (1996) 435–446.
- [76] Jarvis K.G., Girón J.A., Jerse A.E., McDaniel T.K., Donnenberg M.S., Kaper J.B., Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 7996–8000.
- [77] Jones B.D., Falkow S., Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization, *Infect. Immun.* 62 (1994) 3745–3752.
- [78] Kita E., Kamikaidou N., Nakano A., Kashiba S., Isolation of a cytotoxin from L-form *Salmonella typhimurium*, *FEMS Microbiol. Lett.* 109 (1993) 179–184.
- [79] Kukkonen M., Raunio T., Virkola R., Lähteenmäki K., Mäkelä P.H., Klemm P., Clegg S., Korhonen T.K., Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion : binding of type I fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin, *Mol. Microbiol.* 7 (1993) 229–237.
- [80] Lee M.D., Curtiss R., Peay T., The effect of bacterial surface structures on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* infection in chickens, *Avian Dis.* 40 (1996) 28–36.
- [81] Libby S.J., Adams L.G., Ficht T.A., Allen C., Whitford H.A., Buchmeier N.A., Bossie S., Guiney D.G., The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host, *Infect. Immun.* 65 (1997) 1786–1792.
- [82] Libby S.J., Goebel W., Ludwig A., Buchmeier N., Bowe F., Fang F.F., Guiney D.G., Songer J.G., Heffron F., A cytotoxin encoded by *Salmonella typhimurium* is required for survival within macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 489–493.
- [83] Libby S.J., Goebel W., Muir S., Songer G., Heffron F., Cloning and characterization of a cytotoxin gene from *Salmonella typhimurium*, *Res. Microbiol.* 141 (1990) 775–783.
- [84] Lindell K.A., Saeed A.M., McCabe G.P., Evaluation of resistance of four strains of commercial laying hens to experimental infection with *Salmonella enteritidis* phage type eight, *Poult. Sci.* 73 (1994) 757–762.
- [85] Lindgren S.W., Stojiljkovic I., Heffron F., Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 4197–4201.
- [86] Mahan M.J., Slauch J.M., Mekalanos J.J., Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues, *Science* 259 (1993) 686–688.
- [87] Mahan M.J., Tobias J.W., Slauch J.M., Hanna P.C., Collier R.J., Mekalanos J.J., Antibiotic-based selection for bacterial genes that are specifically induced during infection of a host, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 669–673.
- [88] McCormick B.A., Miller S., Carnes D., Madara J.L., Transepithelial signalling to neutrophils by salmonellae: a novel virulence mechanism for gastroenteritis, *Infect. Immun.* 63 (1995) 2302–2309.
- [89] Miller S.I., PhoP/PhoQ: macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence?, *Mol. Microbiol.* 5 (1991) 2073–2078.
- [90] Mills D.M., Bajaj V., Lee C.A., A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome, *Mol. Microbiol.* 15 (1995) 749–759.
- [91] Mills S.D., Finlay B.B., Comparison of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* invasion, intracellular growth and localization in cultured human epithelial cells, *Microb. Pathog.* 17 (1994) 409–423.
- [92] Miras I., Hermant D., Arricau N., Popoff M.Y., Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB*

- genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi. Res. Microbiol. 146 (1995) 17–20.
- [93] Mroczewski-Wiley M.J., Di Fabio J.L., Cabello F.C., Invasion and lysis of HeLa cell monolayers by *Salmonella typhi*: the role of the lipopolysaccharide. Microb. Pathog. 6 (1989) 143–152.
- [94] Niesel D.W., Chambers C.E., Stockman S.L., Quantitation of HeLa cell monolayer invasion by *Shigella* and *Salmonella* species. J. Clin. Microbiol. 22 (1985) 897–902.
- [95] Nnalue N.A., Shnyra A., Hultenby K., Lindberg A.A., *Salmonella choleraesuis* and *Salmonella typhimurium* associated with liver cells after intravenous inoculation of rats are localized mainly in Kupffer cells and multiply intracellularly. Infect. Immun. 60 (1992) 2758–2768.
- [96] Nohmi T., Yamada M., Watanabe M., Murayama S.Z., Sofuni T., Roles of *Salmonella typhimurium* umuDC and samAB in UV mutagenesis and UV sensitivity. J. Bacteriol. 174 (1992) 6948–6955.
- [97] Ochman H., Soncini F.C., Solomon F., Groisman E.A., Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 7800–7804.
- [98] Ogunniyi A.D., Kotlarski I., Morona R., Manning P.A., Role of SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Infect. Immun. 65 (1997) 708–717.
- [99] Oh Y.K., Alpuche-Aranda C., Berthiaume E., Jinks T., Miller S.L., Swanson J.A., Rapid and complete fusion of macrophage lysosomes with phagosomes containing *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 64 (1996) 3877–3883.
- [100] Pascopella L., Raupach B., Ghori N., Monack D., Falkow S., Small P.L.C., Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. Infect. Immun. 63 (1995) 4329–4335.
- [101] Pegues D.A., Hantman M.J., Behlau I., Miller S.L., *PhoP/PhoQ* transcriptional repression of *Salmonella* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. Mol. Microbiol. 17 (1995) 169–181.
- [102] Peralta R.C., Yokoyama H., Ikemori Y., Kuroki M., Kodama Y., Passive immunisation against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella enteritidis*. J. Med. Microbiol. 41 (1994) 29–35.
- [103] Popiel I., Turnbull P.C.B., Passage of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella thompson* through chick ileal mucosa. Infect. Immun. 47 (1985) 786–792.
- [104] Poppe C., Demczuck W., McFadden K., Johnson R.P., Virulence of *Salmonella enteritidis* phagetypes 4, 8 and 13 and other *Salmonella* spp. for day-old chicks, hens and mice. Can. J. Vet. Res. 57 (1993a) 281–287.
- [105] Poppe C., Gyles C.L., Relation of plasmids to virulence and other properties of salmonellae from avian sources. Avian Dis. 31 (1987) 844–854.
- [106] Porter S.B., Curtiss R., Effect of inv mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. Avian Dis. 41 (1997) 45–57.
- [107] Prasad R., Chopra A.K., Peterson J.W., Pericas R., Houston C.W., Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. Microb. Pathog. 9 (1990) 315329.
- [108] Rahman H., Singh V.B., Sharma V.D., Purification and characterization of enterotoxin moiety present in cell-free supernatant of *Salmonella typhimurium*. Vet. Microbiol. 39 (1994) 245–254.
- [109] Rathman M., Barker L.P., Falkow S., The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. Infect. Immun. 65 (1997) 1475–1485.
- [110] Rhen M., Sukupolvi S., The role of a *traT* gene of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid for serum resistance and growth within liver macrophages. Microb. Pathog. 5 (1988) 275–285.
- [111] Richter-Dahlfors A., Buchan. A.M.J., Finlay B.B., Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: *Salmonella typhimurium* resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. J. Exp. Med. 186 (1997) 569–580.
- [112] Riikonen P., Mäkelä P.H., Saari-Lahti H., Sukupolvi S., Taira S., Rhen M., The virulence plasmid does not contribute to growth of *Salmonella* in cultured murine macrophages. Microb. Pathog. 13 (1992) 281–291.
- [113] Rosqvist R., Håkansson S., Forsberg Å., Wolf-Watz H., Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of yersiniae, salmonellae and shigellae. EMBO J. 14 (1995) 4187–4195.
- [114] Shea J.E., Hensel M., Gleeson C., Holden D.W., Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 2593–2597.
- [115] Stein M.A., Leung K.Y., Zwick M., Garcia-del Portillo F., Finlay B.B., Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing

- lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells, *Mol. Microbiol.* 20 (1996) 151–164.
- [116] Stone B.J., Garcia C.M., Badger J.L., Hassett T., Smith R.I.F., Miller V.L., Identification of novel loci affecting entry of *Salmonella enteritidis* into eukaryotic cells, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 3945–3952.
- [117] Swords W.E., Cannon B.M., Benjamin W.H. Jr, Avirulence of LT2 strains of *Salmonella typhimurium* results from a defective rpoS gene, *Infect. Immun.* 65 (1997) 2451–2453.
- [118] Takeuchi A., Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*, *Am. J. Pathol.* 50 (1967) 109–136.
- [119] Tang P., Foubister V., Pucciarelli M.G., Finlay B.B., Methods to study bacterial invasion, *J. Microbiol. Methods* 18 (1993) 227–240.
- [120] Thorns C.J., Turcotte C., Gemmell C.G., Woodward M.J., Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella enteritidis*, *Microb. Pathog.* 20 (1996) 235–246.
- [121] Tsohis R.M., Bäumlér A.J., Heffron F., Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages, *Infect. Immun.* 63 (1995) 1739–1744.
- [122] Tsohis R.M., Bäumlér A.J., Stojilkovic I., Heffron F., Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes, *J. Bacteriol.* 177 (1995) 4628–4637.
- [123] Turnbull P.C.B., Richmond J.E., A model of salmonella enteritis: the behaviour of *Salmonella enteritidis* in chick intestine studied by light and electron microscopy, *Br. J. Exp. Path.* 59 (1978) 64–75.
- [124] Valdivia R.H., Falkow S., Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells, *Science* 277 (1997) 2007–2011.
- [125] Vidal S., Gros P., Skamene E., Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies *Nramp1* as the *Bcg/Ity/Lsh* locus, *J. Leukocyte Biol.* 58 (1995) 382–390.
- [126] Wallis T.S., Paulin S.M., Plested J.S., Watson P.R., Jones P.W., The *Salmonella dublin* virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle, *Infect. Immun.* 63 (1995) 2755–2761.
- [127] Watson P.R., Paulin S.M., Bland A.P., Jones P.W., Wallis T.S., Characterization of intestinal invasion by *Salmonella typhimurium* and *Salmonella dublin* and effect of a mutation in the *invH* gene, *Infect. Immun.* 63 (1995) 2743–2754.
- [128] Weinstein D.L., Carsiotis M., Lissner C.R., O'Brien A.D., Flagella help *Salmonella typhimurium* survive within murine macrophages, *Infect. Immun.* 46 (1984) 819–825.
- [129] Wick M.J., Harding C.V., Twosten N.J., Niormark S., Pfeifer J.D., The *phoP* locus influences processing and presentation of *Salmonella typhimurium* antigens by activated macrophages, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 465–473.
- [130] Wood M.W., Rosqvist R., Mullan P.B., Edwards M.H., Galyov E.E., SopE, a secreted protein of *Salmonella dublin*, is translocated into the target eukaryotic cell via a sip-dependent mechanism and promotes bacterial entry, *Mol. Microbiol.* 22 (1996) 327–338.
- [131] Yancey R.J., Breeding S.A.L., Lankford C.E., Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*, *Infect. Immun.* 24 (1979) 174–180.
- [132] Zierler M.K., Galán J.E., Contact with cultured epithelial cells stimulates secretion of *Salmonella typhimurium* invasion protein Inv, *J. Infect. Immun.* 63 (1995) 4024–4028.