

INRS- Institut Armand-Frappier

Régulation de l'expression du gène *NRAMP1* au cours de la différenciation myéloïde

Thèse présentée pour l'obtention  
du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)  
en Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury                    Dr Albert Descoteaux, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineurs externes                Dr Patrick P. McDonald  
Faculté de médecine  
Université de Sherbrooke

Dr Alain Nepveu  
Groupe d'Oncologie Moléculaire  
Université McGill

Directeur de recherche              Dr Mathieu F Cellier

Droits réservés de Étienne Richer, 2005

## *Résumé*

La protéine NRAMP1 (Natural Résistance Associated Macrophage Protein 1) fait partie d'une famille hautement conservée de transporteurs de métaux divalents tels le fer et le manganèse. Son expression est restreinte aux cellules phagocytaires matures et est associée à la résistance aux infections mycobactériennes causant la tuberculose et la lèpre. Étant établi que l'hormone  $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitamin  $D_3$  (VD) induit la différenciation des cellules myéloïdes pluripotentes en monocytes/macrophages et stimule leur potentiel bactéricide, et que des polymorphismes du récepteur à la VD sont associés à la susceptibilité à la tuberculose et la lèpre, nous avons entrepris l'étude des mécanismes contrôlant l'expression du gène *NRAMP1* dans la lignée cellulaire humaine HL-60, notamment lors de la différenciation monocyttaire induite par la VD.

Nous avons démontré que l'expression de l'ARNm du gène *NRAMP1* dans ce modèle est tardive (comparativement à *CD14*) et conduit à l'expression de la protéine. La protéine NRAMP1 est présente dans la membrane de vésicules cytoplasmiques des cellules de type granulocytaire et monocyttaire. Suite à la phagocytose il y a relocalisation de la protéine au phagosome. Une région de 263 pb en amont de l'ATG de *NRAMP1* permet une activité basale du promoteur tandis qu'un fragment additionnel de 325 pb confère la spécificité myéloïde lors de la différenciation induite par la VD. Trois régions *cis* localisées dans la région conférant la spécificité myéloïde sont essentielles pour l'activation transcriptionnelle lors de la différenciation terminale. La protéine Sp1 (Specificity protein 1) se fixe directement à l'une des régions *cis* et est vraisemblablement associée à une autre région conjointement avec un autre facteur transcriptionnel tel qu'un membre de la famille ETS (E26 Transforming Sequence). Les facteurs de transcription de la famille C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) de même que le facteur CDP1 (CCAAT Displacement Protein) participent quant à eux à la régulation de la région basale *in vitro*. Ces travaux auront donc permis d'identifier une région minimale du promoteur du gène *NRAMP1* possédant deux sites majeurs d'initiation de la transcription régulés par les C/EBP et la CDP1 et de définir une région en amont conférant l'activité myéloïde du promoteur, Sp1 étant un facteur de transcription primordial pour cette régulation.



Étudiant



Directeur de recherche



## *Remerciements*

Durant mon cheminement académique à l'Institut Armand-Frappier, devenu INRS-Institut Armand-Frappier, j'ai eu la chance de pouvoir compter sur l'appui marquant de trois personnes que je veux ici remercier tout particulièrement.

Dans un premier temps mon directeur de recherche, Mathieu, qui a su diriger la progression de ma thèse et me donner le support nécessaire tout en me laissant la latitude et l'indépendance essentiels au développement des compétences pour mener de manière autonome un projet de recherche.

Deux membres du laboratoire présent au début de mes études influencèrent également fortement l'élaboration et le développement de mon projet : Éva qui fut mon premier contact avec le monde de la recherche et grâce à qui j'ai débuté mon projet dans le laboratoire de Mathieu et Jacques pour l'écoute dont il fait preuve et les réflexions qu'il sait faire naître et enrichir par sa présence.

Un soutien financier est essentiel à la formation et au développement des chercheurs. Je dois remercier pour l'appui constant que j'ai reçu la Fondation Armand-Frappier, le FRSQ, les IRSC et le bureau de produits naturels du Canada.

Je tiens à remercier la participation des membres du jury qui, par leurs remarques constructives, ont contribué à l'achèvement de cette thèse.

Pour avoir partagé les moments et fait partie de la vie dans le laboratoire et à l'Institut au fil des dernières années, je tiens à souligner l'importance des collègues de laboratoire (en ordre chronologique): Hortense, Élise, Isabelle, Pascal, Frédéric, Èvelyn, Laetitia, Louise, Carole et Roman. Et noter également le support des amis et collègues, trop nombreux pour les nommer ici sans commettre d'omissions, qui par les discussions, les échanges et leur présence ont permis de créer un environnement stimulant.

Je n'aurais bien évidemment pas pu accomplir ces travaux sans l'appui et l'apport constant de ma famille dans le soutien sans faille dont elle a toujours fait preuve. Depuis mes grands-parents, Guy, Roger, Marguerite et Rita jusqu'à ma soeur, Ariane, et mon frère, Olivier et surtout mes parents Marie-Céline et Michel qui ont toujours supportés les choix pris par leurs enfants.

Élise pour tout ce qui est mentionné plus haut et qui représente tout ce en quoi je crois...

## *Liste des figures et des tableaux*

Figure 1 : Synthèse des radicaux oxygénés et nitrogénés	12
Figure 2 : Boucle de l'IFN $\gamma$ et de l'IL-12	16
Figure 3 : Réactions de Haber-Weiss/Fenton	24
Figure 4 : Intégration de l'hepcidine dans le métabolisme du fer	30
Figure 5 : Myélopoïèse	36
Figure 6 : Synthèse de la forme active de la vitamine D3	42
Figure 7 : Structure d'un promoteur eukaryote et enhanceosome de l'IFN- $\beta$	48
Table 1 : Gènes myéloïdes et leurs facteurs transcriptionnels associés	52
Table 2 : Famille ETS	55

## *Liste des abréviations*

ATRA	All- <i>trans</i> rétinoïc acid
ARNi	ARN inhibiteurs
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CDK	Kinases dépendantes des cyclines
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14
CDP1	CCAAT Displacement Protein 1
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein
CLP	Progéniteur lymphoïde commun (common lymphoid progenitor)
CSF	Colony-Stimulating Factor
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CGD	Chronic Granulomatous Disease
DCT1	Divalent Cation Transporter 1
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTS	Directly Observed Treatment, Shortcourse
EDA-ID	Anhidrotic Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency
ETS	E26 Transforming Sequence
Fura-FF6	Fura-6-FF-triéthylester
GAS	Gamma interferon-activating sequence
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxide d'hydrogène
HIGM	Hyper- IgM
HFE	Hemochromatosis
HL-60	Human leukemic cell line 60
ICSBP	Interferon Consensus Sequence Binding Protein
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
iNOS	Synthase d'oxyde nitrique inductible (ou NOS2)
IRE	Iron Response Element

IRF	Interferon Response Factor
KH	20- <i>epi</i> -22-oxa-24a,26a,27a-tri-homo-1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (KH1060)
LAM	Lipoarabinomannanes
LPS	Lipopolysaccharides
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
Man-LAM	Lipoarabinomannanes avec résidus de Mannose
MEF	Myeloid Elf-1 like Factor
MEP	Progéniteur mégacaryocyte érythrocyte (megakoryocyte erythrocyte progenitor)
NEMO	NF-kB Essential Modulator
NOS2	Synthase d'oxyde nitrique 2 (ou iNOS)
NRAMP1	Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1
NO	Oxyde nitrique
ODNdb	Olinucléotide double brin
Pb	Paire de base
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PKC	Protéine kinase C
PMA	Phorbol myristate acetate
GMP	Progéniteur macrophage granulocyte (granulocyte macrophage progenitor)
PMN	Polymorphonucléaire
PTH	Hormone parathyroïde
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque (ATRA)
Rb	Rétinoblastome
RNI	Radicaux nitrogénés (Reactive nitrogen species)
ROI	Intermédiaires d'oxygène réactif
ROS	Radicaux oxygénés (reactive oxygen species)
RNS	Radicaux nitrogénés (reactive nitrogen species)
RXR	Récepteur de l'acide rétinoïque (9- <i>cis</i> RA)
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SK	Sphingosine kinase



SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superoxide dismutase
Sp1	Specificity protein 1
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAFs	TATA-Associated Factors
Tf	Transferrine
TfR	Récepteurs de la transferrine
TLR	Toll Like Receptors
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
VD	Forme active de la vitamine D (1,25(OH) <sub>2</sub> -vitD <sub>3</sub> )
VDR	Récepteur de la vitamine D (Vitamin D Receptor)
VDRE	Site de réponse à la vitamine D

## ***Table des matières***

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des figures et des tableaux .....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Table des matières.....	x
Problématique .....	1
Chapitre 1: Revue Bibliographique .....	3
1.1 La Tuberculose.....	3
1.1.1 Historique.....	3
1.1.2 Description de l'infection .....	4
1.1.3 Infection des phagocytes par <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
1.1.3.1 Détournement de la phagocytose par <i>M. tuberculosis</i> .....	6
1.1.3.2 Survie intracellulaire de <i>M. tuberculosis</i> .....	7
1.1.3.3 Mycobactéricidie.....	9
1.1.3.4 Persistance des mycobactéries dans l'organisme infecté.....	12
1.1.4 Recherche de gènes de susceptibilité aux infections .....	14
1.1.4.1 Susceptibilité mendélienne aux mycobactéries.....	15
1.1.4.2 La susceptibilité à <i>M. tuberculosis</i> et <i>M. leprae</i> est un trait complexe.....	17
1.2 NRAMP1 .....	20
1.2.1 Historique.....	20
1.2.2 Expression.....	21
1.2.3 Rôle.....	22
1.3 Homéostasie du fer et infection .....	25
1.3.1 NRAMP2 : trois contextes .....	26
1.3.2 Régulation par l'hormone peptidique Hepsidine.....	27
1.3.3 Acquisition du fer par <i>M. tuberculosis</i> .....	30
1.4 Famille NRAMP .....	32
1.4.1 NRAMP1 dans l'immunité naturelle des mammifères.....	32
1.4.2 Paralogie Nramp chez les vertébrés.....	33
1.5 Myélopoïèse.....	35

1.5.1 Régulation de la myélopoïèse par les CSF.....	37
1.5.1.1 IL-3 .....	37
1.5.1.2 GM-CSF.....	38
1.5.1.3 M-CSF.....	39
1.5.1.4 G-CSF .....	39
1.5.2 HL-60 comme modèle de progéniteur myéloïde .....	40
1.5.3 Régulation de la myélopoïèse par la forme active de la vitamine D <sub>3</sub> .....	41
1.5.3.1 Synthèse de la forme active de la vitamine D <sub>3</sub> .....	41
1.5.3.2 La 1 $\alpha$ 25-dihydroxyvitamine D <sub>3</sub> : hormone et cytokine.....	42
1.5.4 Contrôle transcriptionnel par la 1 $\alpha$ 25-dihydroxyvitamine D <sub>3</sub> .....	44
1.5.4.1 VDR(s).....	44
1.5.4.2 Analogues de la VD .....	45
1.5.4.3 Différenciation terminale.....	46
1.5.5 Spécificité de la transcription dans la différenciation myéloïde.....	47
1.5.5.1 Déterminants du promoteur .....	47
1.5.5.2 Facteurs de transcription impliqués .....	52
1.5.5.2.1 Sp1 .....	52
1.5.5.2.2 C/EBP .....	53
1.5.5.2.3 PU.1 .....	53
1.5.5.2.4 MEF .....	54
1.5.5.2.5 CDP.....	55
1.5.5.3 <i>CD14</i> et <i>CD18</i> : deux gènes régulés dans les cellules myéloïdes.....	56
Perspective sur les travaux effectués .....	57
Chapitre 2: Premier article.....	59
Mise en contexte du premier article.....	59
Chapitre 3: Deuxième article .....	105
Mise en contexte du second article.....	105
Chapitre 4 : Troisième article.....	142
Mise en contexte du troisième article .....	142
Chapitre 5 : Résultats supplémentaires .....	190
Figure supplémentaire 1 .....	190
Figure supplémentaire 2 .....	191

Figure supplémentaire 3 .....	192
Figure supplémentaire 4.....	193
Figure supplémentaire 5.....	194
Chapitre 6 : Discussion .....	195
Régulation de l'expression de NRAMP1.....	195
Contrôle transcriptionnel .....	195
Expression de la protéine.....	197
Mécanisme d'action de la VD.....	198
Fragment du promoteur conférant la spécificité myéloïde .....	199
Recherche des éléments cis contrôlant l'expression myéloïde .....	200
Caractérisation des sites conférant la spécificité myéloïde.....	201
E10 .....	201
E6 .....	202
E2 .....	204
E3 .....	205
Région basale de transcription du gène <i>NRAMP1</i> .....	206
Conservation de la régulation de l'expression des gènes humain et murin .....	208
Spécificité de la régulation myéloïde de <i>NRAMP1</i> .....	209
Analyse globale des facteurs de transcription.....	210
Évaluation directe des facteurs <i>in vivo</i> .....	211
Chapitre 7 : Conclusions.....	213
Bibliographie.....	214

## Problématique

Au début du siècle les maladies infectieuses étaient la première cause de mortalité en occident ; la tuberculose, les pneumonies et les diarrhées hémorragiques causant 30% des décès. L'amélioration des conditions sanitaires et l'introduction d'agents antimicrobiens a permis durant le siècle dernier de réduire considérablement la mortalité associée aux maladies infectieuses, l'espérance de vie passant aux États-Unis de 47 à 76 ans et les principales causes de mortalité étant maintenant associées aux maladies chroniques, cardiaques et aux cancers (Cohen 2000). Nous assistons cependant aujourd'hui à une recrudescence des maladies infectieuses causée entre autres par l'apparition de bactéries multirésistantes aux antibiotiques, les co-infections avec le VIH et l'émergence de nouveaux pathogènes.

*Mycobacterium tuberculosis* représente un exemple type de cette réémergence. Véritable fléau avant l'amélioration des conditions sanitaires et l'apparition des premiers antibiotiques, cette maladie dont l'importance historique fut presque oubliée en occident revient aujourd'hui au nombre des problèmes de santé publique. L'antibiothérapie qui nécessite de 6-8 mois de traitement amène bien souvent l'arrêt prématuré du traitement, ce qui a favorisé l'émergence et la dissémination de souches multirésistantes aux antibiotiques (Espinal 2003). Le cocktail du VIH avec *M. tuberculosis* est également particulièrement explosif. Dans certaines régions d'Afrique, plus de 30% des nouveaux cas de tuberculose sont attribués à une co-infection avec le VIH (Corbett *et al.* 2003), tandis qu'en Occident de 40% à 80% des sidéens développeront la tuberculose (Dye *et al.* 2002). Dans le contexte actuel il est donc primordial d'approfondir nos connaissances sur les relations hôte/pathogènes afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de l'infection. Une meilleure connaissance des interactions complexes entre hôte et pathogène pourra nous amener à moduler l'immunité naturelle de l'hôte pour répondre de manière efficace à un pathogène tel que *M. tuberculosis* et à envisager des cibles thérapeutiques novatrices pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes.

Depuis 1954, date de la publication d'un rapport associant la résistance à la malaria à une variabilité des érythrocytes (Allison 1954), la recherche de gènes de résistance aux infections dans la population humaine a permis de lier le polymorphisme de plusieurs gènes avec une susceptibilité à certaines infections. Cependant, cette approche fort utile lors de l'analyse d'influences monogéniques se complique lors d'analyses multifactorielles, notamment en ce qui a trait aux infections.

Dans cet esprit, l'analyse génétique murine représente une approche complémentaire aux études chez l'homme. Chez la souris, l'analyse est notamment facilitée par la reproductibilité des infections, l'homogénéité des conditions environnementales et la stabilité génétique des lignées. Le premier gène correspondant à un phénotype de sensibilité ainsi identifié chez la souris est *Nramp1* (Natural resistance associated macrophage protein), gène associé à la sensibilité à certains parasites intracellulaires (Salmonelles, mycobactéries et leishmanias) (Vidal *et al.* 1993). En retour, l'analyse d'homologues humains aux gènes de résistance identifiés chez la souris permet d'approfondir les mécanismes de pathogenèse, comme dans le cas du gène *NRAMP1* pour lequel des polymorphismes furent associés à la susceptibilité à la lèpre (Abel *et al.* 1998) et la tuberculose (Bellamy *et al.* 1998).

Cette association a permis de révéler le rôle de la protéine NRAMP1 dans l'arsenal antimicrobien de notre organisme. Son expression est strictement restreinte aux phagocytes matures et localisée à la membrane de certaines vésicules qui fusionnent notamment avec le phagosome de mycobacterium (Gruenheid *et al.* 1997) et qui contribuent à l'élimination du pathogène (Govoni *et al.* 1999).

# Chapitre 1: Revue Bibliographique

## *1.1 La Tuberculose*

### **1.1.1 Historique**

Tuberculosis is a social disease with a medical aspect.

- Sir William Osler (1849-1919) cité dans (Grzybowski et Allen 1999)

L'augmentation démographique d'une population vivant dans un espace restreint constitue la première cause de l'augmentation du facteur de risque de transmission des maladies infectieuses. Ainsi, la prévalence de la tuberculose a progressé depuis l'implantation des premières habitations humaines 8000 ans avant JC jusqu'au 19<sup>e</sup> siècle. L'implantation du bacille tuberculeux a suivi l'augmentation de la sédentarité, prenant graduellement de l'importance avec l'accroissement de la taille des habitations. Des études épidémiologiques démontrent aussi qu'une population minimale de 180 à 440 personnes est estimée nécessaire à l'établissement endémique de la tuberculose (McGrath 1988). La propagation de la tuberculose a donc suivi l'adoption d'un mode de vie sédentaire, s'implantant à différentes époques dans les différentes civilisations.

L'Europe féodale a connu les premières épidémies de tuberculose, maladie qui reçut alors l'appellation de peste blanche. Durant le développement économique de l'Europe de l'Ouest au 17<sup>e</sup> et 18<sup>e</sup> siècle, qui s'est fait conjointement avec un accroissement de la population des villes dans un contexte où les conditions d'hygiène étaient précaires, la tuberculose trouva un terrain fertile : 1 décès sur 4 lui était alors attribué (Hopewell 1994). L'amélioration des conditions sanitaires au 20<sup>e</sup> siècle et la découverte de la streptomycine par Selman Abraham en 1943 amenèrent une décroissance de la prévalence de la maladie en Occident.

Cette décroissance est toutefois aujourd'hui arrêtée et nous observons même une recrudescence des cas de tuberculose causés notamment par la possibilité de co-infection avec le VIH et l'apparition de bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Un des foyers

de développement important de souches de mycobactéries résistantes à tous les antibiotiques actuellement disponibles est le réseau de prisons de la Russie où la prévalence de la tuberculose est 200 fois supérieure à celle de la population en général et là où le suivi des traitements n'est pas appliqué rigoureusement. Il y a donc inexorablement une transmission de ces bacilles résistants vers la population puis une dissémination à travers les différents continents. Le dernier antibiotique introduit sur le marché pour contrer la tuberculose date de 1972 et celui en développement le plus prometteur (le PA-824) ne débutera la phase 1 de son étude clinique qu'au cours de l'année 2005. La recherche de gènes de résistances comme alternative thérapeutique devient donc primordiale (Grondin et Tisseyre 2002, GATDD 2004).

### **1.1.2 Description de l'infection**

L'infection par *M. tuberculosis* est asymptomatique dans 90% des cas. Ce pourcentage varie cependant grandement selon l'âge ou l'état de santé du patient. Il existe deux grands types de tuberculose; 85% sont dits pulmonaires tandis que le 15% sont qualifiés d'extra-pulmonaires (statistiques valides pour les patients sans co-infection au VIH) (Farer *et al.* 1979). Nous nous intéresserons principalement aux infections pulmonaires bien que seront abordées les infections extra-pulmonaires dans la section sur les gènes de susceptibilité. Les principaux symptômes de la tuberculose pulmonaire sont la toux, la dyspné (difficulté à respirer) et la fièvre. La maladie est souvent accompagnée d'infections opportunistes. Le diagnostic est effectué par test à la tuberculine, radiographie et culture bactérienne (Hopewell 1994).

La transmission du bacille se fait principalement par voie aérienne suite à la projection d'aérosols par la toux. En 2002, une seule étudiante tuberculeuse de l'Université de Montréal a infecté à son insu plus de 130 personnes de son entourage (Grondin et Tisseyre 2002). Le bacille pénètre dans l'organisme par voie respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires, lieu de l'infection primaire. Durant cette phase, *M. tuberculosis* établit une niche répliquative dans le macrophage, ce qui constitue la première étape de la formation d'un granulome. Certaines bactéries seront alors disséminées dans l'organisme



vers les organes lymphatiques où il y aura stimulation de l'immunité adaptative (Kaufmann 2001).

Pour la majorité des individus infectés, il y aura alors contrôle de la multiplication bactérienne et élimination du bacille de l'organisme. Par contre, certains individus n'élimineront pas le bacille et resteront porteurs sains, servant de réservoir au pathogène. De 5 à 10% d'entre eux développeront la tuberculose dans les deux années suivant l'infection, permettant alors la dissémination du bacille (Bloom et Murray 1992). Une infection diagnostiquée et traitée adéquatement amènera la résolution de l'infection et le rétablissement de l'hôte, bien que le traitement soit long (plusieurs mois) et souvent traité partiellement, favorisant la poursuite de la maladie et le développement de résistance aux traitements.

Afin d'endiguer la tuberculose, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a mis sur pied le programme DOTS (Directly Observed Treatment, Shortcourse). Ce programme implique un dépistage par frottis des personnes qui présentent des symptômes, l'approvisionnement en quantité et en qualité de médicaments adéquats et le suivi des patients durant les 6 à 8 mois du traitement. Les antituberculeux actuellement utilisés sont l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide, la streptomycine et l'éthambutol utilisés en combinaison afin de limiter le développement de résistance. L'observance de ce programme amène le rétablissement des patients dans 95% des cas (OMS 2004). L'efficacité de ce programme est cependant mise en doute, puisque dans plusieurs régions où le programme est appliqué il y a eu une augmentation allant jusqu'à 200% du nombre de personnes infectées (Brewer et Heymann 2004). Cette augmentation est cependant liée à la forte co-infection avec le VIH et le directeur actuel du programme « Stop TB » de l'OMS souligne que le programme est efficace dans plusieurs pays qui ne connaissent pas d'épidémie de sida de l'ampleur de celle retrouvée en Afrique (Nelson 2004).

Dans la prochaine section nous détaillerons les facteurs influençant les différentes étapes menant à la résolution ou à la progression de l'infection. Cette section sera traitée selon quatre aspects; la phagocytose, la survie, la mort et la persistance de *M. tuberculosis*.

### 1.1.3 Infection des phagocytes par *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1.1.3.1 Détournement de la phagocytose par *M. tuberculosis*

Le premier objectif des mycobactéries pathogènes lorsqu'elles pénètrent dans un hôte est d'atteindre leur niche répliquative, le phagosome. Pour y parvenir, elles vont favoriser leur internalisation en interagissant avec un grand nombre de récepteurs de phagocytose. L'interaction entre le macrophage et *M. tuberculosis* est également facilitée par le récepteur bactérien Ck qui se lie au cholestérol membranaire de l'hôte (Kaul *et al.* 2004). Cette interaction semble également favoriser l'accumulation de la protéine eucaryote TACO qui augmente la survie de la bactérie dans le phagosome (Gatfield et Pieters 2000). La phagocytose par les récepteurs du complément, principalement associée à la première phase de l'infection, favorise *in vitro* la survie du pathogène. La mycobactérie qui se retrouve initialement dans les poumons, est opsonisée notamment avec la protéine SP-A (Surfactant Protein-A) et celles du complément. Cette opsonisation favorise la phagocytose via notamment les récepteurs du complément (CR1, CR3, CR4), le récepteur du mannose et les « scavenger receptors ». Les mycobactéries pathogènes, comparativement aux mycobactéries non pathogènes, favorisent ainsi l'entrée « silencieuse » dans le macrophage par les récepteurs du complément en interagissant spécifiquement avec C2a (Gatfield et Pieters 2000) ou avec le récepteur au mannose (Schlesinger 1993; Beharka *et al.* 2002) qui peut favoriser une entrée anti-inflammatoire dans le macrophage (Allavena *et al.* 2004; Kudo *et al.* 2004).

Suite à la production d'anticorps spécifiques à *M. tuberculosis*, le récepteur Fcγ sera à son tour sollicité pour augmenter la phagocytose de la bactérie. Bien que normalement la phagocytose des bactéries par les récepteurs Fc entraîne la perte rapide de viabilité des bactéries, *M. tuberculosis* montre une adaptation particulière à son hôte et résiste à la bactéricidie du macrophage (Armstrong et Hart 1975). Cette résistance est également démontrée expérimentalement puisque lors d'infections de souris knock-out pour le récepteur du complément CR3, la survie intracellulaire du pathogène n'est que faiblement affectée (Melo *et al.* 2000). Pour le pathogène, il est primordial d'atteindre la niche répliquative qu'est le phagosome, la clé de sa survie résidant dans sa capacité à résister à

cet environnement plutôt que dans le contrôle des récepteurs engagés lors de la phagocytose.

### **1.1.3.2 Survie intracellulaire de *M. tuberculosis***

*Mycobacterium* dispose de deux mécanismes principaux afin de survivre à l'intérieur du macrophage et d'y établir sa niche répliquative. Dans un premier temps, le pathogène peut arrêter la maturation du phagosome en phagolysosome, ce qui semble constituer son principal moyen de résistance. Cet arrêt de maturation est spécifique aux mycobactéries pathogènes puisqu'il n'est observé ni lors de la phagocytose de bactéries pathogènes tuées ni lors de la phagocytose de mycobactéries non pathogènes. Un second mécanisme de résistance impliquant la survie du pathogène à l'intérieur de phagolysosomes de macrophages activés a également été récemment démontré.

Traditionnellement, la survie dans les phagocytes des mycobactéries pathogènes est décrite comme étant causée par l'arrêt de la maturation du phagosome. Ce modèle est bien décrit et caractérisé par des expériences *in vitro*. La protéine TACO (Ferrari *et al.* 1999) et la GTPase Rab5, qui dirigent la fusion avec les endosomes précoces, restent associées avec le phagosome de *M. tuberculosis* tandis que la GTPase Rab7 (Via *et al.* 1997), qui permet la fusion avec les lysosomes et les endosomes tardifs, et la protéine EEA1, qui favorise les fusions des bicouches lipidiques et qui est nécessaire à la fusion des vésicules lysosomales avec le phagosome (Fratti *et al.* 2001), restent exclues de ce phagosome. Ce phagosome immature résiste également à l'acidification par un mécanisme d'exclusion des ATPases vacuolaires (Sturgill-Koszycki *et al.* 1994), bien qu'il soit intéressant de noter à ce point que la présence de la protéine Nramp1 permet une certaine acidification des phagosomes contenant le BCG (MacMicking *et al.* 1997; Hackam *et al.* 1998). Malgré l'arrêt de la maturation du phagosome, des échanges continus ont lieu entre ce compartiment et les endosomes du « transferrin recycling pathway » (Clemens et Horwitz 1995) (Sturgill-Koszycki *et al.* 1996). Cette situation permet au microorganisme d'avoir accès à un apport constant de nutriments venant du milieu extérieur, notamment de métaux tel le fer, tout en étant dans un milieu protégé de « l'environnement » extérieur au macrophage (ex : sécrétions des neutrophiles).

La paroi des mycobactéries pathogènes est composée de lipoarabinomannanes modifiés dont les chaînes latérales possèdent principalement des résidus mannose (Man-LAM) tandis que la paroi des mycobactéries non pathogènes est plus riche en inositolphosphates. La paroi de Man-LAM interfère avec l'augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'associe normalement avec la calmoduline et qui peut ensuite induire l'autophosphorylation de la sérine/thréonine kinase CaMKII. Cette phosphorylation permet le recrutement de la PI3K qui à son tour amènera le recrutement de EEA1 à la membrane du phagosome pour finalement permettre la fusion avec les vésicules endosomales (Koul *et al.* 2004). Toute cette cascade menant à la maturation du phagosome est bloquée dès l'étape initiale par l'unité qui inhibe la sphingosine kinase (SK) (Malik *et al.* 2003), une kinase qui agit sur les lipides de la paroi des stock de  $\text{Ca}^{2+}$  du ER pour la rendre perméable et ainsi permettre l'augmentation du niveau intracellulaire de calcium.

La présence de cholestérol dans la coupe phagosomale semble également être importante pour l'inhibition de la maturation du phagosome. Cette présence accrue de cholestérol permet une vague précoce de phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) (Chua et Deretic 2004), le produit de la PI3K. Ceci est possiblement causé par l'association d'une PI3K avec des domaines lipidiques dépendant du cholestérol (Simons et Toomre 2000). En effet, en plus de bloquer les vagues de PI3P normalement observées lors de la maturation du phagosome (grâce à l'inhibition de SK), l'unité amène une vague précoce de PI3P avant la fermeture du phagosome.

Le pathogène peut également interférer avec la signalisation d'assemblage du réseau d'actine autour du phagosome, réseau permettant le transport efficace des organelles dans le cytoplasme afin de favoriser les interactions entre le phagosome et les endosomes. Les médiateurs lipidiques, tels la céramide ou S1P (sphingosine-1-phosphate), sont ciblés par le pathogène. Le traitement de macrophages infectés avec de l'acide arachidonique, des céramides, de la sphingosine ou de la sphingomyéline permet d'augmenter la bactéricidie face à *M. tuberculosis* (Anes *et al.* 2003).

L'arrêt de la maturation du phagosome n'est pas le seul mécanisme de survie de mycobacterium dans le macrophage. Les résultats, principalement obtenus avec des lignées cellulaires immortalisées, ne peuvent expliquer certaines observations faites avec des cellules primaires ou avec certains modèles animaux d'infection. Dès le début des années 1970 des études démontrant la survie de *M. lepraemurium* dans les phagolysosomes (Hart *et al.* 1972) de même que la réplication et la survie de *M. tuberculosis* dans le phagolysosome de macrophages suite à la phagocytose de bactéries opsonisées par les récepteurs Fc (Armstrong et Hart 1975) suggéraient qu'il était faux de croire que la survie des mycobactéries dans le phagosome se résumait à une niche dans un phagosome immature. Une étude plus récente vient confirmer l'association de *M. tuberculosis* avec des phagolysosomes dans des macrophages alvéolaires humains fraîchement isolés de patients (Borelli *et al.* 2002).

La démonstration la plus élégante de l'association de mycobactéries avec des macrophages activés nous vient du modèle d'infection de grenouilles avec *M. marinum*. Dans ce modèle, *M. marinum* se réplique et co-existe avec des macrophages activés; 60% des bactéries résident dans des phagosomes possédant les caractéristiques de phagolysosomes (Bouley *et al.* 2001). Cet état est associé à un stade tardif de l'infection caractérisé notamment par la présence de granulomes organisés, dans lesquels *M. marinum* exprime de manière spécifique une classe de gènes qui ne sont pas exprimés lors d'infections *in vitro* (Borelli *et al.* 2002). Bien que les mécanismes de survie des mycobactéries dans ces conditions ne soient pas encore définis, il est particulièrement intéressant de noter que la protéine NRAMP1 est présente dans les phagolysosomes des macrophages activés. Dans ce mécanisme de survie, *M. tuberculosis* est donc spatialement et temporellement confronté à NRAMP1 qui peut alors jouer un rôle direct dans l'équilibre délicat entre le pathogène et l'hôte.

### 1.1.3.3 Mycobactéricidie

Dans bien des cas la phagocytose sera bactéricide. Le phagosome progressera en phagolysosome, il y aura fusion du phagosome avec les endosomes tardifs puis avec les lysosomes, acidification du phagosome à un pH de 4.5-5.0 et activation des hydrolases.

Durant ce processus il y aura également production des radicaux oxygénés (ROS) et nitriques (RNI).

L'état d'activation du macrophage est un des facteurs clé permettant de contrôler la bactérie phagocytée. Le principal modulateur de l'activation du macrophage *in vivo* est l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Flynn et Chan 2001). Les macrophages en contact avec les mycobactéries vont produire de l'IL-12, une cytokine qui active les lymphocytes T. Suite à cette stimulation, ces derniers produisent du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et de l'IFN $\gamma$  qui ira à son tour activer les macrophages. *In vitro*, le macrophage activé produit des phagolysosomes contenant *M. tuberculosis* dont le pH se situe à 5.2 et il y a diminution progressive du nombre de mycobactéries viables (Schaible *et al.* 1998; Via *et al.* 1998). L'IFN $\gamma$  active au moins deux voies menant au contrôle des pathogènes; celle de la synthase d'oxyde nitrique 2 (NOS2) et celle nouvellement identifiée de la LGR47 (MacMicking *et al.* 2003) dont l'effet bactéricide est indépendant de NOS2. LGR-47 fait partie de la famille des guanosines triphosphatases (GTPase) de 47kDa, une famille de protéines impliquées dans la résistance aux pathogènes intracellulaires (Taylor *et al.* 2004).

Le principal agent bactéricide contre les mycobactéries est l'oxyde nitrique (NO) (Nathan 2002). L'administration d'inhibiteurs de la synthase d'oxyde nitrique inductible (iNOS) dans des souris infectées mais ne présentant pas de symptômes entraîne leur mort rapide par le bacille tuberculeux (Chan *et al.* 1995) et les souris knock-out pour l'iNOS sont également plus sensibles au bacille (MacMicking *et al.* 1997). Chez l'humain, l'importance du NO fut longtemps remise en question. Aucun défaut génétique associé à iNOS n'est connu et l'administration d'inhibiteurs de iNOS n'a bien évidemment jamais été effectuée. Des études ont cependant démontré que la production de ce composé est augmentée par l'activation des macrophages humains avec l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et la vitamine D (VD) (Rockett *et al.* 1998) qui augmentent l'expression de la synthase d'oxyde nitrique 2 (NOS2). Des macrophages extraits par lavages broncho alvéolaires ont démontré l'expression de iNOS chez des patients atteints de tuberculose, tandis que seulement 10% des individus sains expriment l'enzyme (Nicholson *et al.* 1996). Parallèlement, des

polymorphismes du promoteur du gène *iNOS* associés à une expression accrue de iNOS confèrent une résistance à la malaria (Levesque *et al.* 1999), suggérant ainsi l'importance de cette enzyme dans le contrôle de certains pathogènes.

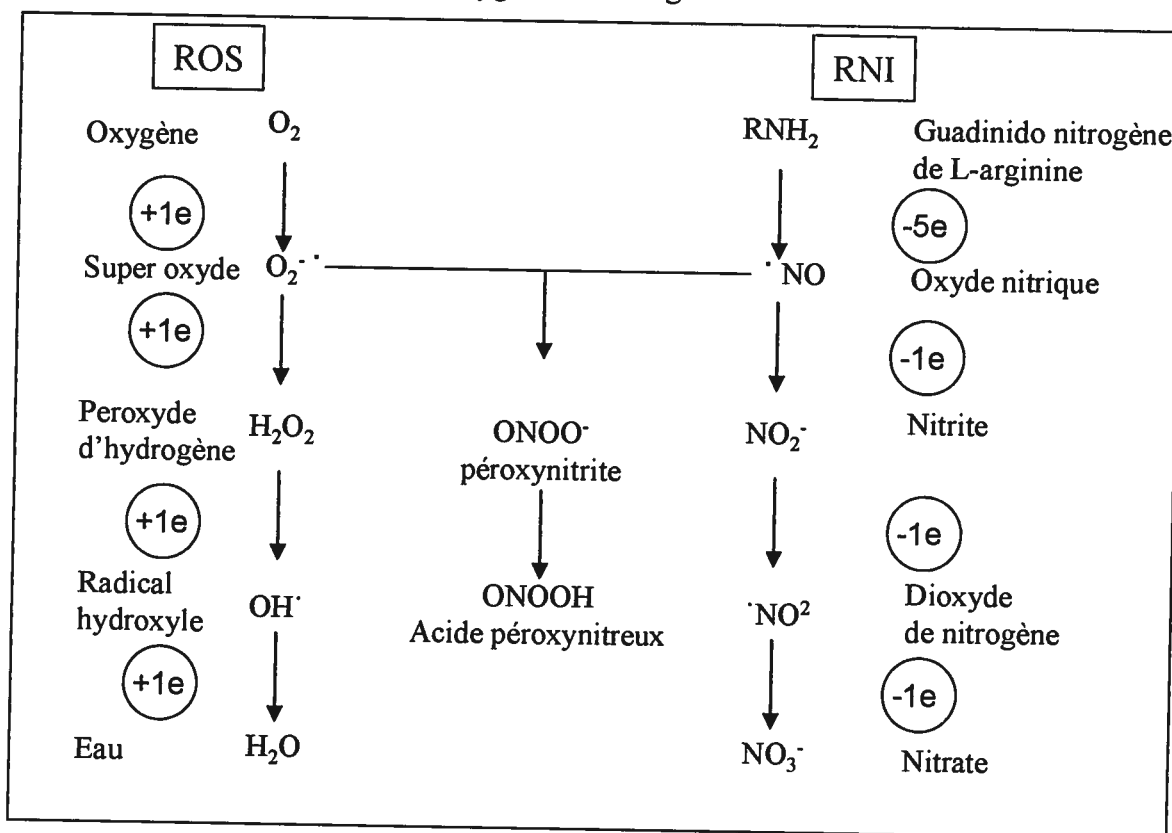
Comparativement au NO, les radicaux oxygénés (ROI) semblent participer plus modestement à la mycobactéricidie, le pathogène possédant les enzymes nécessaires pour détoxifier les ROI (Flynn et Chan 2001). Des souris déficientes pour la NADPH oxydase ont une sensibilité faiblement accrue aux infections (Cooper *et al.* 2000). Cependant, les humains souffrant de CGD (chronic granulomatous disease), défaut de la NADPH phagocyte oxydase, ont une plus grande susceptibilité à la tuberculose (Lau *et al.* 1998), démontrant l'impact sur le développement de la tuberculose des radicaux oxygénés. Ces derniers ont donc un rôle dans le contrôle de *M. tuberculosis*, tant chez la souris que chez l'humain.

Les ROI et les RNI peuvent avoir un rôle bactéricide. La protéine iNOS produit du NO, qui pourra former du dioxyde de nitrogène (NO<sub>2</sub>), du trioxyde d'azote (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), des complexes de fer dinitrosyl, du nitrosothiol, du nitroxy (HNO) et finalement du peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) en interagissant avec les anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). L'oxydase du phagocyte (phox) produit quant à elle le superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) qui formera par la suite du peroxyde d'hydrogène, des radicaux oxygénés (OH<sup>-</sup>) et de l'acide hypochlorique (HOCl). Ces composés bactéricides auront différentes cibles : thiols, centres métalliques, protéines tyrosines, nucléotides et lipides (Fang 2004). Le NO agira de manière plus spécifique en inhibant la respiration bactérienne (Stevanin *et al.* 2000) et les enzymes impliquées dans la réplication bactérienne (Schapiro *et al.* 2003) tandis que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> agit principalement en causant des modifications et des bris à l'ADN bactérien (Imlay et Linn 1988).

Les ROI et RNI sont également impliqués dans la signalisation cellulaire comme neurotransmetteurs, dans l'activation des phagocytes, dans le métabolisme du fer, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Fang 2004). En plus d'agir directement en tant que composés bactéricides, il est fort probable que ces composés affectent plus globalement la réponse face à *M. tuberculosis* en agissant directement au niveau du transcriptome (Ehrt *et al.* 2001; Kobayashi *et al.* 2004). Le NO et l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> peuvent apporter des modifications

post-traductionnelles à certains facteurs transcriptionnels sous la forme d'oxydation ou de nitrosylation. Parmi les facteurs de transcription susceptibles à de telles modifications, nous retrouvons NFκ-B, AP-1, p53 (Bogdan 2001) et la grande famille des facteurs de transcription à doigts de zinc (Kroncke et Carlberg 2000). En plus d'avoir un rôle bactéricide direct, les ROI et RNI sont donc impliqués également dans l'état global d'activation du macrophage, état qui est crucial dans la réponse à *M. tuberculosis*.

Figure 1 : Synthèse des radicaux oxygénés et nitrogénés



Adapté de (Fang 2004)

#### 1.1.3.4 Persistance des mycobactéries dans l'organisme infecté

La persistance de *M. tuberculosis* fut longtemps vue comme un processus durant lequel la bactérie entrait dans une phase de dormance protégée dans une structure semblable à une spore. Ce dogme se trouve aujourd'hui modifié, le granulome étant maintenant perçu comme un élément dynamique. Suite à l'infection primaire, il y a réponse de l'immunité adaptative et contrôle de la multiplication du pathogène. C'est à ce moment que se



développe une structure organisée, le granulome. Cette structure devient le site de persistance du pathogène dans l'organisme et favorise la transmission de la maladie lorsque le granulome se brise, ce qui permet le relâchement d'un liquide contenant des bactéries infectieuses qui seront alors transmises par la toux. Les granulomes sont cependant essentiels pour contenir l'infection, puisque des individus ne formant pas de granulomes succombent rapidement à une tuberculose disséminée (Cosma *et al.* 2003).

Bien que les granulomes soient essentiels à la défense contre les mycobactéries, *M. tuberculosis* exploite et favorise le développement de ces structures. Cette bactérie possède en effet un locus de virulence (RD1) d'approximativement 10 kb qui est absent chez les souches avirulentes comme le BCG (Behr et Small 1999). Ce locus possède notamment un système de sécrétion spécialisé et deux facteurs de virulence qui affecteront la lyse des macrophages *in vitro* (Guinn *et al.* 2004) et une diminution de la réponse pro-inflammatoire des macrophages (Stanley *et al.* 2003). Il a finalement été démontré que ce locus favorise l'agrégation des macrophages et la formation de granulomes (Volkman *et al.* 2004). Il est donc attrayant de proposer un modèle dans lequel *M. tuberculosis*, via RD1, favorise la formation de granulomes, diminue la réponse inflammatoire à l'intérieur de ceux-ci puis favorise la lyse des macrophages dans la cavité nécrosée du granulome jusqu'à ce qu'il y ait rupture de ce dernier puis dissémination du bacille. Ces structures peuvent donc être considérées comme un autre exemple de l'adaptation très poussée des mycobactéries à leur hôte; la balance entre l'infection, la transmission du bacille, la maladie et la rémission étant très fine et complexe.

L'étape initiale du développement des granulomes est le recrutement de macrophages autour d'un macrophage infecté. Ces macrophages deviennent activés et peuvent fusionner, formant plusieurs cellules géantes qui entourent toujours la cellule infectée. Il y a ensuite recrutement de cellules T effectrices, lymphocytes B, cellules dendritiques, neutrophiles et finalement d'autres macrophages qui se différencieront en cellules épithéloïdes (Peters et Ernst 2003). Si le pathogène survit à cette réponse immunitaire, il y aura alors formation d'une barrière épithéliale autour du granule puis éventuellement développement de tissus fibreux et calcification du granulome (Monack *et al.* 2004). Des résultats récents suggèrent qu'un équilibre actif s'établit alors au centre de cette structure

entre la réplication et la destruction des mycobactéries (Bouley *et al.* 2001), amenant une persistance de l'infection pouvant durer plusieurs années. Une théorie plus ancienne voulait que les bactéries restent dans un état métabolique actif mais ne se répliquent pas activement. Cette théorie est cependant actuellement délaissée suite au nouvel éclairage fourni par les études récentes.

#### **1.1.4 Recherche de gènes de susceptibilité aux infections**

La relation entre *M. tuberculosis* et l'hôte est complexe et constitue un équilibre précaire entre la résolution de l'infection, la persistance asymptomatique dans l'hôte et la manifestation pathologique de l'infection, la tuberculose. Cet équilibre est issu d'une longue co-habitation entre le parasite et l'hôte, pour ne pas dire co-évolution. De part et d'autre, il y a eu sélection naturelle afin d'augmenter les chances de survie. La connaissance des processus mis en jeu pour atteindre ce but permet de mieux comprendre l'évolution de la maladie, d'envisager des traitements plus appropriés et de connaître éventuellement les risques possible de développer la maladie en fonction de son patrimoine génétique.

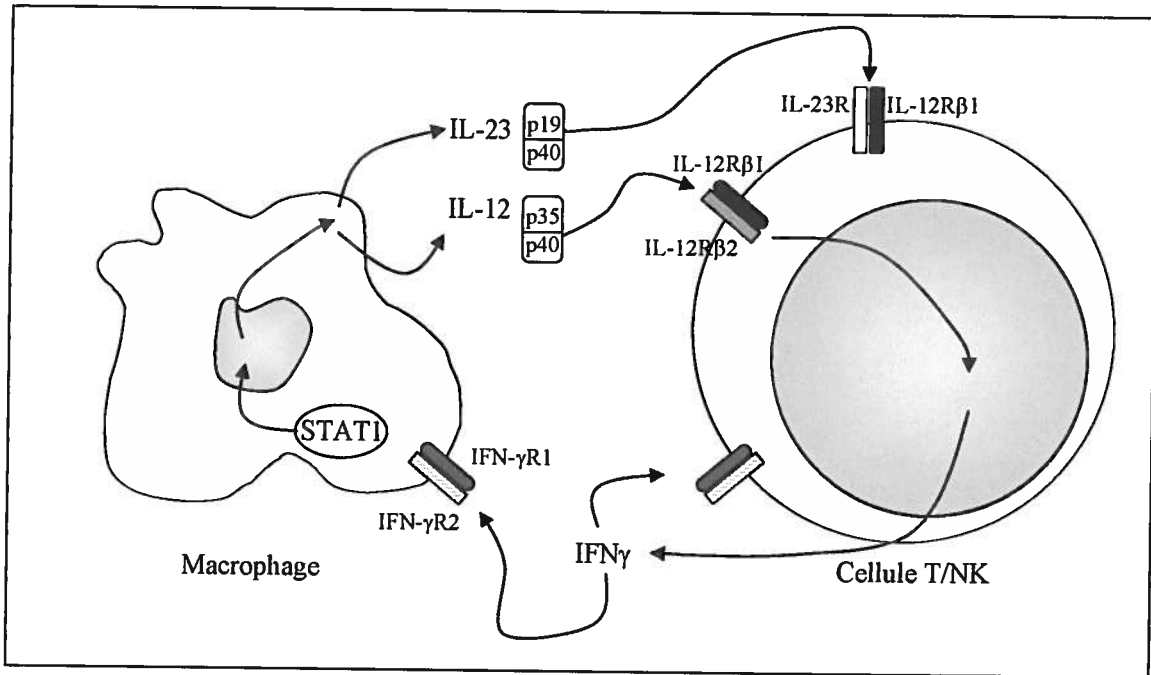
La susceptibilité aux infections est bien souvent multifactorielle et forme un trait complexe. Plusieurs gènes affectent le phénotype de susceptibilité à la tuberculose, sans toutefois qu'aucun ait un effet majeur. Dans un tel cas, la recherche de gènes de susceptibilité dans la population est compliquée par l'effet relativement faible de chaque gène sur le phénotype. Plus l'effet d'un gène est faible, plus il est difficile d'établir une association entre le gène et le phénotype par analyse d'association dans le génome entier. Ce type d'analyse peut notamment être effectué à l'intérieur de grandes familles où l'on tente par analyse de ségrégation d'identifier les régions chromosomiques qui ségréguent avec le phénotype étudié. Une telle méthode possède l'avantage d'utiliser des polymorphismes de répétitions ce qui permet de balayer le génome entier afin d'identifier de nouveaux gènes ou locus de susceptibilité. Ces derniers devront cependant avoir un impact élevé sur le phénotype dans la population observée afin d'être identifiés par cette méthode.

Une alternative à l'analyse globale est de procéder par la recherche d'associations avec des gènes candidats ; en posant l'hypothèse qu'un gène affecte un phénotype donné il est alors possible de détecter des associations entre les polymorphismes du gène ciblé et la susceptibilité. Puisque la région étudiée est restreinte, la sensibilité de la méthode est augmentée. La difficulté d'une telle approche repose sur la sélection appropriée des gènes à étudier. Cette sélection peut être dirigée en se basant sur des résultats obtenus par l'étude de modèles animaux ou par des expériences avec des cellules humaines.

#### **1.1.4.1 Susceptibilité mendélienne aux mycobactéries**

La susceptibilité mendélienne aux infections mycobactériennes (incluant les mycobactéries environnementales non-pathogènes) est retrouvée chez des individus ayant une déficience dans la boucle d'activation de l'IL-12 et de l'IFN $\gamma$  (MSMD ou Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease). Les individus possédant une déficience dans cette boucle montrent une sensibilité accrue spécifique aux mycobactéries et dans une moindre mesure aux salmonelles. Comme nous avons vu, l'activation des macrophages par l'IFN $\gamma$  est primordiale pour stimuler leur potentiel mycobactéricide. Des mutations affectant la sous-unité p40 de l'IL-12 (également une composante de l'IL-23), de la chaîne  $\beta$ 1 du récepteur à l'IL-12 (également une composante du récepteur de l'IL-23), des deux chaînes du récepteur de l'IFN $\gamma$  (1 et 2) de même que du facteur de transcription STAT1 ont été trouvées chez différents patients pédiatriques hypersensibles aux mycobactérioses, notamment au BCG (Casanova et Abel 2004).

Figure 2 : Boucle de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-12



Adapté de (Casanova et Abel 2004)

D'autres susceptibilités mendéliennes sont documentées pour des infections bactériennes de manière plus générale, incluant les mycobactérioses. Ces défauts génétiques peuvent affecter l'expression et la fonction de plusieurs protéines telles certaines composantes de la NADPH oxydase (CGD), CD154 (HIGM) ou NEMO (EDA-ID) (Casanova et Abel 2002). Ce dernier cas souligne encore une fois l'importance de l'IFN $\gamma$  dans le contrôle des mycobactéries. La protéine NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) est mutée chez les patients souffrant de dysplasie ectodermique anhidrotique avec immunodéficience (EDA-ID). Cette déficience entraîne un défaut global de la signalisation par NF- $\kappa$ B qui modifie, entre autre, la production d'IL-12 par le macrophage et donc une baisse subséquente de production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T et les cellules NK (Natural Killer) (Feinberg *et al.* 2004). Ces mutations sont toutefois rares et constituent plutôt des maladies génétiques que des polymorphismes modulant la susceptibilité aux infections. Pour analyser ces derniers, nous devons passer à l'analyse des traits complexes.

#### 1.1.4.2 La susceptibilité à *M. tuberculosis* et *M. leprae* est un trait complexe

La recherche de gènes de susceptibilité aux mycobactéries pathogènes dans le génome entier a été le sujet de quatre études jusqu'à présent. La première étude, réalisée dans la population de Gambie et d'Afrique du Sud, n'a pas permis d'identifier de gènes ou de loci majeurs associés à la susceptibilité à la tuberculose (Bellamy *et al.* 2000). Une faible association avec la région du gène UBE3A sur le chromosome 15 a été rapportée (Cervino *et al.* 2002). Deux études furent par la suite menées avec des familles indiennes et vietnamiennes. La première a permis d'établir une relation modérée (lod (likelihood) score 3.48) avec le fragment chromosomal 10p13 (Siddiqui *et al.* 2001) et avec le fragment chromosomal 20p12 (Tosh *et al.* 2002). La seconde étude a permis d'associer le fragment chromosomal 6q35 (lod 4.31) avec la susceptibilité à la lèpre (Mira *et al.* 2003). La mutation responsable de cette susceptibilité est située dans le promoteur commun aux gènes PARK2 et PARCG (Mira *et al.* 2004) ; deux gènes exprimés dans le macrophage et les cellules de Schwann, deux types cellulaires infectés par *M. leprae*. La dernière étude à ce jour fut réalisée avec des familles brésiliennes et combine la recherche de susceptibilité à la lèpre et la tuberculose (Miller *et al.* 2004). Deux régions sur les chromosomes 11 et 17 démontrent une association faible avec les infections mycobactériennes.

De ces recherches de gènes de susceptibilité dans l'intégralité du génome, il découle quelques régions candidates pour lesquelles encore peu de gènes sont connus. Aucune région ne s'est retrouvée associée avec la susceptibilité aux infections mycobactériennes dans toutes les études. Ceci souligne d'autant plus l'aspect complexe de cette susceptibilité et la variabilité qui peut exister entre les différentes populations au niveau des polymorphismes. L'association de la susceptibilité avec PARK2, un gène lié auparavant avec le Parkinson, démontre toutefois la validité de l'approche pour attribuer de nouvelles fonctions ou de nouvelles voies métaboliques à des gènes connus.

Une approche complémentaire aux études sur le génome complet consiste à rechercher une association entre les polymorphismes d'un gène candidat et la susceptibilité à une maladie. Ces études ont l'avantage d'être moins fastidieuses et ont une plus grande sensibilité que l'analyse globale. La limite d'une telle technique est le nombre de gènes candidats et la définition de ces derniers. Certains de ces gènes sont identifiés pour des

raisons historiques par analyse de modèles animaux ou encore par analyse de gènes impliqués dans des maladies génétiques.

Historiquement, la vitamine D est associée au traitement d'infections mycobactériennes. Une étude datant de 1946 décrit en effet le traitement du *lupus vulgaris* (infection cutanée de *M. tuberculosis*) avec une application de VD (Dowling 1946). Avant le développement d'antibiothérapies, le traitement de la tuberculose reposait sur l'exposition au soleil ce qui favorisait la production de la forme active de la vitamine D et sur l'administration d'huile de foie de morue, riche en vitamine D. L'hormone VD augmente *in vitro* la mycobactéricidie des macrophages (Rook *et al.* 1986). Puisque le récepteur de la VD (VDR) permet la signalisation intracellulaire de l'hormone stéroïdienne et que le gène codant pour le VDR possède plusieurs polymorphismes, ce gène fut donc étudié en tant que gène candidat prédisposant à la tuberculose et la lèpre. L'importance des polymorphismes du VDR fut par la suite confirmée par des études d'associations (Roy *et al.* 1999; Bellamy *et al.* 1999; Bornman *et al.* 2004).

La boucle d'activation IL-12/IFN $\gamma$  est bien définie par certaines maladies génétiques rares comme étant primordiale à la défense contre les mycobactéries. Une des composantes de cette boucle d'activation est le récepteur de l'IL-12 dont une mutation faux-sens dans la chaîne $\beta$ 1 (IL12R $\beta$ 1) entraîne l'absence d'expression du récepteur (Sakai *et al.* 2001). Peu de gènes impliqués dans des maladies génétiques sont également associés avec des polymorphismes affectant la susceptibilité. Une telle association a toutefois été établie entre des polymorphismes du gène codant pour l'IL12R $\beta$ 1 et la susceptibilité à la tuberculose au Maroc (Remus *et al.* 2004) et en Chine (Tso *et al.* 2004).

Le premier membre isolé de la famille des Toll Like Receptors (TLR), Toll, est une protéine de l'immunité de la drosophile (Lemaitre *et al.* 1997) impliquée dans la réponse aux infections fongiques. Par la suite, TLR4 fut isolé par clonage positionnel dans des lignées murines sensibles au LPS chez la souris (Qureshi *et al.* 1999; Poltorak *et al.* 1998). Par homologie de séquence, 10 homologues ont été identifiés chez les eucaryotes. TLR2 est responsable de l'activation des macrophages murins en réponse aux composants de la paroi cellulaire de *M. tuberculosis in vitro* (Underhill *et al.* 1999). Dans le cas des

TLR, c'est donc une fonction affectant la coordination de la réponse inflammatoire chez la souris qui a permis d'identifier un gène candidat chez l'humain qui affecte la sensibilité à la tuberculose et la lèpre. Les études d'association ont effectivement confirmé l'impact des polymorphismes du gène humain TLR2 tant pour la tuberculose (Ben-Ali *et al.* 2004) que pour la lèpre (Kang et Chae 2001).

Une autre méthode permettant d'isoler des gènes candidats est la caractérisation de lignées murines présentant le phénotype recherché. Dès le début des années 1980, il était connu que la sensibilité au BCG, aux salmonelles et aux leishmanias de certaines lignées murines était conférée par le locus *Ity/Lsh/Bcg* (Skamene *et al.* 1982). Le clonage positionnel du gène *Nramp1* comme déterminant génétique de cette susceptibilité (Vidal *et al.* 1993), puis l'identification de son homologue humain, *NRAMP1*, sur le chromosome 2q35 (Cellier *et al.* 1994), identifia donc *NRAMP1* comme gène candidat à la susceptibilité aux infections mycobactériennes. Des polymorphismes du gène *NRAMP1* ont été associés avec la tuberculose ou la lèpre.

Les polymorphismes des régions 5' et 3' du gène *NRAMP1* font partie de deux blocs d'haplotypes non liés. Une étude d'association effectuée dans la population Gambienne a permis d'associer la susceptibilité à la tuberculose avec deux groupes indépendants de polymorphismes, l'un en 5' et l'autre en 3' (Bellamy *et al.* 1998). De plus, les individus possédant les allèles de susceptibilité pour les deux groupes démontraient un facteur de risque beaucoup plus important. Deux autres études d'association récentes confirment le lien avec les polymorphismes en 3' et la susceptibilité à la tuberculose dans la population chinoise des Han (Liu *et al.* 2004) et dans une population Africaine au Malawi (Fitness *et al.* 2004).

L'étude d'une grande famille aborigène ayant récemment subi une épidémie de tuberculose est probablement la preuve la plus importante de l'implication de la région chromosomique portant le gène *NRAMP1* (Greenwood *et al.* 2000) dans la modulation de la susceptibilité à la tuberculose. Dans cette étude, l'allèle de risque du gène *NRAMP1*, ou d'un gène situé tout près de ce dernier, augmente jusqu'à dix fois la probabilité de développer la tuberculose, ce qui identifie pour la première fois dans la population

humaine un gène ayant un impact significatif sur la tuberculose. Puisque cette population a été peu exposée au bacille tuberculeux dans son histoire, il est donc possible que des allèles de plus forte susceptibilité y soient présents, tandis que ces derniers auraient été contre-sélectionnés dans des populations vivant depuis longtemps avec le bacille tuberculeux.

## ***1.2 NRAMP1***

### **1.2.1 Historique**

Au 19<sup>e</sup> siècle, des collectionneurs élevaient des souris pour leurs caractéristiques physiologiques particulières (fancy mice). Au début du 20<sup>e</sup> siècle, certaines de ces lignées de souris furent sélectionnées et utilisées en laboratoire. Une sensibilité accrue de certaines de ces lignées génétiquement stables fut observée il y a plus de 30 ans face à différents pathogènes intracellulaires : *Leishmania donovani* (*Lsh*) (Bradley 1974), *Salmonella typhimurium* (*Ity*) (Plant et Glynn 1976) et *Mycobacterium bovis* BCG (*Bcg*) (Skamene *et al.* 1982). Il fut démontré que les trois gènes conférant cette susceptibilité étaient sur le même fragment du chromosome 1 (Mock *et al.* 1990) et que le patron de résistance/susceptibilité des lignées murines pour les trois pathogènes concordait, indiquant que le même locus était impliqué (Plant *et al.* 1982; Skamene *et al.* 1982). Tel que mentionné plus haut, le gène responsable fut isolé par clonage positionnel (Vidal *et al.* 1993) et nommé *Nramp*. Le gène est maintenant désigné *Nramp1* depuis le clonage d'un homologue nommé *Nramp2* (Gruenheid *et al.* 1995). Chez l'homme, le gène *NRAMP1* a récemment reçu la désignation de SLC11A1 (solute carrier family 11 member 1) dans l'annotation génomique.

Le gène code pour une phosphoglycoprotéine de 550 acides aminés qui ne présentait, au moment de son clonage, aucune similarité importante avec d'autres polypeptides. La protéine possède 12 segments transmembranaires, un motif de transport conservé des sites de phosphorylation et deux sites de N-glycosylation (Cellier *et al.* 1995; Vidal *et al.* 1996). La forte glycosylation de la protéine représente jusqu'à 50% de sa masse qui varie de 90 à 100 kDa. Une substitution dans le domaine transmembranaire 4 (G169D) qui



empêche l'expression de la protéine (Vidal *et al.* 1993; Vidal *et al.* 1996) est responsable du phénotype de susceptibilité des lignées murines. Ce phénotype est reproduit dans une lignée résistante (129S1) en effectuant un knock-out de *Nramp1* (Vidal *et al.* 1995) tandis que la transgénèse de *NRAMP1* dans une lignée sensible confère la résistance (Govoni *et al.* 1996) aux infections. Peu de temps après le clonage positionnel de *Nramp1*, un homologue humain, *NRAMP1* (Cellier *et al.* 1994) et un homologue murin *Nramp2* (Gruenheid *et al.* 1995) furent décrit, créant le noyau de la famille *NRAMP*.

### 1.2.2 Expression

*NRAMP1* chez l'humain est exprimée, en ordre décroissant d'abondance, dans les cellules du sang périphérique, les poumons, la rate et le foie (Cellier *et al.* 1994). Chez la souris, l'expression de *Nramp1* dans le poumon est beaucoup plus faible que chez l'humain (Buschman et Skamene 2001), ce qui pourrait être important dans la réponse à *M. tuberculosis*. Cette distribution tissulaire correspond à l'expression restreinte du gène dans les macrophages et les granulocytes (Vidal *et al.* 1993). L'expression dans les macrophages est augmentée suite à une stimulation avec des lipopolysaccharides (LPS) et de l'IFN $\gamma$  (Govoni *et al.* 1997), simulant *in vitro* une activation dans un contexte infectieux.

Les monocytes et les PMN humains circulants expriment le gène *NRAMP1* et l'expression est plus élevée dans les PMN que dans les monocytes. La migration des monocytes dans les tissus et leur différenciation terminale en macrophages permet l'augmentation de l'expression de *NRAMP1*, et ce particulièrement dans les alvéoles pulmonaires. L'expression de *NRAMP1* dans la lignée cellulaire promyélocytaire HL-60 n'est observée que suite à la différenciation de cette dernière en type monocytaire ou granulocytaire. La bipotentialité de cette lignée est exploitée par stimulation avec la VD ou le phorbol myristate acetate (PMA) pour sa différenciation monocytaire et avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou du diméthylformamide (DMF) pour sa différenciation granulocytaire (Cellier *et al.* 1997). L'acide rétinoïque (ATRA) entraîne également la différenciation granulocytaire de la lignée cellulaire sans toutefois augmenter l'expression de l'ARNm de *NRAMP1* (Cellier *et al.* 1997), ce qui concorde avec la description de

mécanismes de différenciation alternatifs pour les deux inducteurs granulocytaires dans la lignée HL-60 (Van Roozendaal *et al.* 1990) et avec l'existence de deux voies de différenciation *in vivo* (Zhang *et al.* 2002). Dans ce modèle, l'augmentation de l'expression de l'ARNm avec le stade de différenciation cellulaire *in vitro* concorde avec l'expression *in vivo* qui est restreinte aux phagocytes matures.

La protéine membranaire intégrale Nramp1 n'est pas exprimée à la membrane cytoplasmique, mais est plutôt localisée dans la membrane de vacuoles cytoplasmiques des phagocytes au repos. La vacuole Nramp1 positive correspond à un stade d'endosome tardif ou de lysosome précoce. Nramp1 colocalise avec le marqueur Lamp-1 (Gruenheid *et al.* 1997), ce qui l'exclut des compartiments normalement associés à la GTPase Rab5. Suite à la phagocytose, la protéine Nramp1 est recrutée au phagosome naissant avec une cinétique semblable à celle du marqueur Lamp-1 et tardive comparativement à la cinétique de la protéine Rab5 qui est associée aux premiers stades de développement du phagosome. Le recrutement de Nramp1 au phagosome a été démontré pour différents types de particules phagocytées, notamment des billes de latex (Gruenheid *et al.* 1997), *Leishmania* (Searle *et al.* 1998), *Salmonella* (Govoni *et al.* 1999; Cuellar-Mata *et al.* 2002), *Mycobacteria* (Frehel *et al.* 2002) et *Yersinia* (Govoni *et al.* 1999).

### 1.2.3 Rôle

Avant le clonage positionnel de *Nramp1*, les effets pléiotropiques observés chez les souris sensibles ont alimenté une spéculation active sur le rôle de la protéine. Les macrophages de souris résistantes produisent plus de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et de O<sup>2-</sup> lorsqu'ils sont infectés par le BCG ou stimulés avec de l'IFN $\gamma$  (Denis *et al.* 1988), ont une présentation antigénique supérieure (Johnson et Zwilling 1985; Denis *et al.* 1988) et expriment plus fortement le marqueur de différenciation AcM.1 (Buschman *et al.* 1989). La réponse aux cytokines est modifiée, notamment dans le cas du GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) (Morrissey et Charrier 1990). Une plus grande production de TNF- $\alpha$  par les macrophages résistants fut également décrite initialement lors de l'infection par *L. donovani* (Blackwell *et al.* 1988) puis par *M. tuberculosis* (Rojas *et al.* 1999). Toutes ces observations ont amené des hypothèses selon lesquelles le gène responsable pourrait être

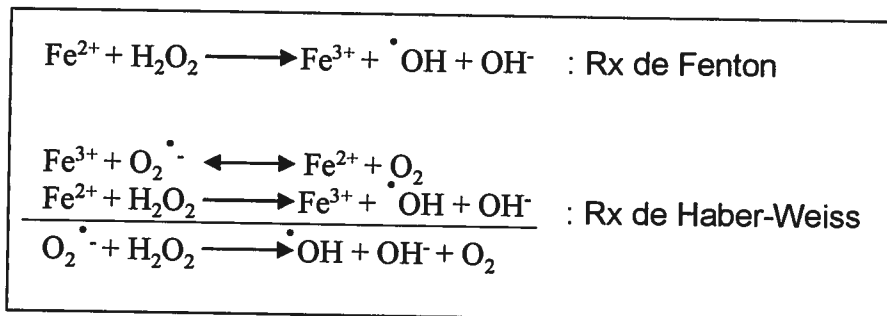
un facteur de transcription, une interleukine autocrine, une molécule associée à la protéine kinase C (PKC) ou encore une protéine du cytosquelette (Buschman et Skamene 2001).

La séquence du gène identifié a finalement révélé que la protéine impliquée était probablement un transporteur. Le groupe qui a cloné le gène proposa initialement que ce transporteur était impliqué dans le transport du nitrate (Vidal *et al.* 1993). Parallèlement à l'identification de Nramp comme transporteur, un autre groupe persistait à chercher un rôle plus direct de la protéine dans l'activation des macrophages (Roach *et al.* 1994) croyant qu'un transporteur ne pouvait expliquer tous les effets observés. La nature du substrat du transporteur resta inconnue jusqu'en 1996, date de la caractérisation de SMF1, un homologue de Nramp chez *Saccharomyces cerevisiae*, codant pour un transporteur de  $Mn^{2+}$  (Supek *et al.* 1996; Supek *et al.* 1997). Les auteurs (Supek *et al.*) ont proposés un modèle dans lequel Nramp1, recruté au phagosome, permet de priver les bactéries phagocytées de  $Mn^{2+}$  qui est un cofacteur essentiel à la superoxyde dismutase (SOD). Cette enzyme est essentielle pour la détoxification des radicaux oxygénés qui permet aux bactéries de mieux résister au stress oxydatif. Deux autres groupes ont identifié l'année suivante *NRAMP2* comme transporteur de fer et autres métaux divalents. Chez le rat, *DCT1* (divalent cation transporter) est l'homologue *NRAMP2* qui agit comme symporteur de protons et de métaux divalents ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  et  $Pb^{2+}$ ) (Gunshin *et al.* 1997). En parallèle était identifié *Nramp2* dans des souris souffrant d'anémie microcytique (Fleming *et al.* 1997). Bien que la conservation des séquences et des fonctions des homologues *SMF1* et *Nramp2* suggérait que *Nramp1* fonctionnait selon le même mécanisme, la mise en évidence expérimentale restait difficile et des résultats contradictoires ont généré une nouvelle controverse.

La proposition que *NRAMP1* agissait comme antiporteur reposait sur l'hypothèse selon laquelle l'ajout de fer dans le phagosome augmente le stress oxydatif en favorisant la réaction de Haber-Weiss/Fenton (voir encadré). La première étude qui proposa cette hypothèse se basait sur l'étude du transport de fer radioactif dans des cellules entières ainsi que dans des phagosomes isolés de macrophages *Nramp1*<sup>+</sup> et démontrait une augmentation du fer associé aux phagosomes *NRAMP1*<sup>+</sup> (Kuhn *et al.* 1999; Kuhn *et al.* 2001). Le même groupe a par la suite présenté des résultats démontrant que l'ajout d'une

faible quantité de fer dans le milieu permet d'augmenter la bactéricidie des macrophages (Zwilling *et al.* 1999). Nramp1 a également été décrit comme antiporteur dans des oocytes de xénopes à pH 9 (mais pas à pH 7.5) (Goswami *et al.* 2001). Finalement, il a été proposé dernièrement que Nramp1 aurait un effet protecteur face au stress oxydatif à l'intérieur du cytoplasme en diminuant la concentration de fer libre pouvant participer à la réaction de Haber-Weiss/Fenton (Yeung *et al.* 2004).

Figure 3 : Réactions de Haber-Weiss/Fenton



Par analogie de fonction avec tous les autres membres de la famille Nramp, qui agissent comme symporteur, il paraît cependant fort peu probable que Nramp1 ait inversé le sens de son transport tout en gardant une forte similarité de séquence nucléotidique avec *NRAMP2* (78%). Dans un modèle d'infection *in vivo* avec *M. avium*, l'ajout de dextran couplé avec du fer augmente la susceptibilité à l'infection et diminue le phénotype de résistance conféré par Nramp1 (Gomes et Appelberg 1998), soulignant l'importance de priver le pathogène de fer pour la résistance de l'hôte. En accord avec ce principe, la transfection et l'expression de *Nramp1* dans des cellules COS-7 (Atkinson et Barton 1998) et RAW264.7 (Atkinson et Barton 1999) entraîne une réduction de l'accumulation du fer dans la cellule. Les auteurs de ces études ont proposé un modèle dans lequel Nramp1 exporterait les métaux divalents de l'espace phagosomal vers le cytoplasme, les métaux étant dans un second temps exportés à l'extérieur de la cellule par un autre transporteur.

La première observation directe du transport du  $\text{Mn}^{2+}$  à l'extérieur du phagosome fut effectuée en imagerie en temps réel. Cette technique repose sur l'utilisation du Fura-6-FF-triethylester (Fura-FF6), une sonde fluorescente couplée au zymosan dont la fluorescence

est résistante au pH et diminuée de manière réversible par le  $Mn^{2+}$ . Cette technique a permis de démontrer que les phagosomes de cellules  $Nramp1^+$  accumulent moins de  $Mn^{2+}$  que les cellules  $Nramp1^-$ . Inversement, lorsque les particules de zymosan-Fura-FF6 étaient préalablement incubées avec du  $Mn^{2+}$ , les macrophages  $Nramp1^+$  permettaient d'exclure plus rapidement le  $Mn^{2+}$  des phagosomes comparativement à leur contrepartie  $Nramp1^-$  (Jabado *et al.* 2000). Le même groupe a récemment réussi à exprimer la protéine  $Nramp1$  avec un épitope HA entre les segments transmembranaires 7 et 8 à la membrane plasmique de cellules CHO. Ce modèle a permis de confirmer que la protéine est un transporteur permettant l'accumulation intracytoplasmique de  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  (Forbes et Gros 2003). La controverse semble maintenant résolue ;  $NRAMP1$  est un transporteur pH-dépendant qui permet d'exclure les métaux divalents du phagosome en suivant le gradient de proton.

### ***1.3 Homéostasie du fer et infection***

Les mammifères possèdent deux protéines  $NRAMP$ ;  $NRAMP1$  et  $NRAMP2$ , agissant tous les deux probablement comme symporteurs de métaux divalents. En accord avec leur fonction respective,  $NRAMP2$  possède une affinité supérieure pour le fer tandis que  $NRAMP1$  possède une affinité supérieure pour le manganèse (Forbes et Gros 2003). L'organisme nécessite environ 25 mg de fer par jour pour la synthèse de métalloprotéines. L'érythropoïèse nécessite à elle seule 20 mg de ce fer pour la synthèse de l'hémoglobine des quelques 200 millions d'érythrocytes produits par jour (Hentze *et al.* 2004). L'apport quotidien par la diète est de 2 mg de fer par jour pour équilibrer les pertes. Cet apport se doit d'être régulé finement afin de ne pas entraîner d'anémie ou de surcharge en fer puisque l'organisme ne possède pas de moyens d'excrétion du fer. La régulation s'effectue donc uniquement au niveau de l'absorption par le système digestif. Le reste des besoins quotidiens du corps est assuré principalement par les macrophages recyclant le fer des érythrocytes sénescents. La protéine  $NRAMP2$  joue un rôle central dans ces deux mécanismes.

### 1.3.1 NRAMP2 : trois contextes

NRAMP2 joue un rôle primordial dans le recyclage du fer des érythrocytes sénescents, ce qui permet aux macrophages de recycler plus de 20 mg de fer par jour. Dans les macrophages, la protéine NRAMP2 est localisée dans la membrane des endosomes de recyclage qui fusionnent avec les phagosomes contenant des érythrocytes (Jabado *et al.* 2002). Dans ce milieu légèrement acidifié, NRAMP2 peut donc transporter le  $\text{Fe}^{2+}$  vers le cytoplasme du macrophage. Il est estimé que la réserve de fer présente dans les macrophages du système réticuloendothélial est de 600mg, alors que la réserve de fer couplé à la transferrine dans la circulation sanguine est de 3 mg (Hentze *et al.* 2004). L'importance de cette réserve dans la séquestration du fer sera abordée ultérieurement dans le contexte de l'infection.

La protéine NRAMP2 est également fortement exprimée dans la bordure en brosse du duodénum et cette expression est régulée par la quantité de fer de l'organisme (Canonne-Hergaux *et al.* 1999). La protéine est co-exprimée dans la partie apicale des entérocytes avec des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPases qui génèrent le gradient de proton permettant le co-transport de  $\text{Fe}^{2+}$  avec  $\text{H}^+$  (Mackenzie et Hediger 2004). Puisque le fer absorbé dans la diète est principalement trivalent, l'action préalable dans le milieu intestinal de la ferriréductase DctyB est essentielle pour réduire le fer sous sa forme  $\text{Fe}^{2+}$  avant qu'il puisse être importé par NRAMP2 (McKie *et al.* 2001). L'export du  $\text{Fe}^{2+}$  de la cellule se fait par la suite à la membrane basolatérale par la ferroportine (IREG1) (McKie *et al.* 2000; Donovan *et al.* 2000). Le  $\text{Fe}^{2+}$  peut alors être transformé en  $\text{Fe}^{3+}$  par la ferrioxydase membranaire Hephaestine (Vulpe *et al.* 1999) ou par la céruloplasmine sanguine (Anderson *et al.* 2002).

Dans la circulation, le fer est principalement associé à la transferrine, une protéine liant avec une haute affinité deux atomes de  $\text{Fe}^{3+}$ . Il existe deux récepteurs de la transferrine, TfR1 et TfR2. TfR1 est exprimé de manière ubiquitaire et est impliqué dans le cycle de la transferrine, permettant de fournir la quantité de fer nécessaire au développement cellulaire, notamment des érythrocytes (Hentze *et al.* 2004). En plus de la transferrine, le TfR1 s'associe avec la protéine HFE, un homologue du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1, qui est associée de manière non-covalente avec la  $\beta$ 2-

microglobuline pour être exprimé à la membrane et qui fait compétition de manière directe avec la holotransferrine pour l'association avec le TfR, offrant un mécanisme de contrôle supplémentaire de l'acquisition de fer (Cheng *et al.* 2004; Giannetti et Bjorkman 2004). Suite à la liaison de la transferrine diférique au TfR1, il y a endocytose du complexe récepteur/transferrine/fer puis acidification de la vacuole qui permet la dissociation du  $Fe^{3+}$ . Le  $Fe^{3+}$  sera de nouveau réduit en  $Fe^{2+}$  pour être transporté de l'endosome au cytoplasme par NRAMP2 (Fleming *et al.* 1998). Le récepteur de la transferrine est finalement retourné à la membrane plasmique avec NRAMP2 pour recommencer le cycle (Touret *et al.* 2003).

L'épissage alternatif de l'ARNm de NRAMP2 permet l'expression de quatre isoformes; une variation en 5' dirigeant la spécificité tissulaire et la séquence en 3' étant dotée ou non selon d'un élément de réponse au fer (IRE) (Hubert et Hentze 2002). L'ARNm exprimé dans les cellules épithéliales du duodénum est principalement un isoforme possédant un élément de réponse au fer (IRE), ce qui permet l'expression de la protéine en réponse à une carence en fer. À l'opposé, l'ARNm exprimé dans les cellules du sang dans lesquelles l'expression de la protéine est constitutive est principalement dépourvu d'IRE (Tabuchi *et al.* 2002). Cette double régulation à la fois constitutive et inductible permet au gène *NRAMP2* de jouer son rôle tant au niveau de l'absorption du fer de la diète que dans le cycle de la transferrine et le recyclage du fer par les macrophages.

### 1.3.2 Régulation par l'hormone peptidique Hepcidine

L'expression du TfR2 est restreinte aux hépatocytes, aux cellules de la crypte duodénale et aux cellules érythroïdes (Kawabata *et al.* 1999; Kawabata *et al.* 2001). Tout comme TfR1, ce récepteur lie la transferrine, mais semble cependant être impliqué dans le contrôle de l'homéostasie du fer plutôt que dans l'absorption de ce métal (Camaschella *et al.* 2000; Fleming *et al.* 2002). Les patients avec une mutation de HFE présentent une expression d'hepcidine plus faible (Bridle *et al.* 2003) et l'expression transgénique de l'hepcidine corrige le défaut des souris déficientes pour HFE en ce qui concerne le dépôt de fer dans le foie (Nicolas *et al.* 2003). Le rôle de HFE semble être d'augmenter la production d'hepcidine en réponse à une forte concentration en fer (Nemeth *et al.* 2004).

Dans ce modèle, une concentration suffisante de fer lié à la transferrine amène une signalisation par le TfR2 qui augmente la production d'hépcidine. Une lignée murine déficiente pour TfR2 souffre d'ailleurs d'hémochromatose causée par une faible production d'hépcidine qui n'est pas induite par la surcharge en fer (Kawabata *et al.* 2004). Un des modes d'action proposé de ce peptide est de réduire l'absorption intestinale du fer en inhibant spécifiquement l'expression de NRAMP2 (Yamaji *et al.* 2004) ainsi qu'en diminuant l'efflux de fer via l'exporteur ferroportine à partir des entérocytes, macrophages et leukocytes (Nemeth *et al.* 2004).

L'hépcidine est un peptide riche en cystéines de 25 aa qui est produit par le foie sous la forme d'un précurseur, et qui est excrété par les reins. Initialement décrit comme un peptide antibactérien (Krause *et al.* 2000; Park *et al.* 2001), il fut par la suite rapidement associé à la régulation du fer (Pigeon *et al.* 2001). L'hépcidine ressort aujourd'hui comme la molécule régulatrice centrale du fer permettant, en condition normale, de maintenir l'homéostasie du fer dans l'organisme, notamment via la stimulation du TfR2 par le complexe fer/transferrine. L'expression de l'hépcidine est également régulée par l'hypoxie, par un mécanisme encore inconnu, qui permet de diminuer l'expression du peptide en carence d'oxygène (Nicolas *et al.* 2002) et donc d'augmenter la concentration de fer pour répondre à la production accrue d'érythrocytes. Finalement, l'hépcidine permet de réguler l'absorption du fer en réponse à l'inflammation (Nicolas *et al.* 2002; Weinstein *et al.* 2002), ce qui établit un lien directe entre l'infection, la production d'IL-6 qui induit l'expression de l'hépcidine de façon indépendante de TfR2 et la restriction de la disponibilité du fer dans l'organisme.

Bien qu'essentielle et régulée finement, l'homéostasie du fer est rompue par l'organisme lors d'infections chroniques afin de limiter l'approvisionnement en fer des pathogènes. L'anémie causée par l'infection fut décrite en 1932 et la réaction systémique entraînant la séquestration du fer dans les cellules du système réticuloendothélial et la diminution de l'absorption du fer fut élucidée dans les années 1950 et 1960 (tiré de (Andrews 2004)). De plus, cette anémie peut être reproduite chez la souris en injectant du LPS. L'importance de cette anémie dans le contrôle des infections est soulignée par des lectures du médecin français Armand Trousseau qui avait fait l'observation qu'une diète

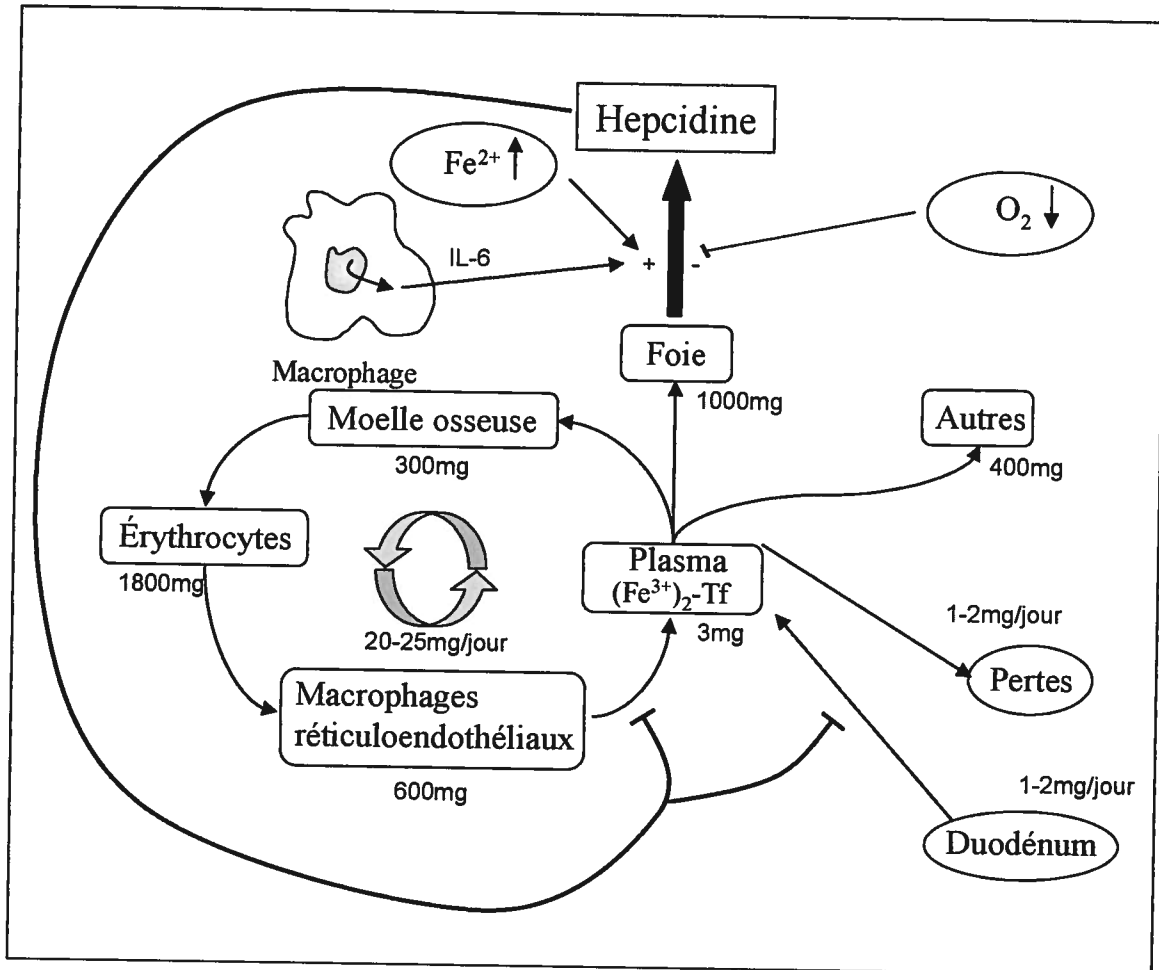


riche en fer favorisait la virulence de la tuberculose en... 1872 (tiré de (Ratledge 2004))!  
L'anémie associée aux infections chroniques se caractérise par une faible concentration sérique de fer malgré une concentration normale ou élevée de ferritine. Cette anémie est causée par une séquestration du fer dans les macrophages et une absorption intestinale diminuée (Jurado 1997).

Le lien entre l'infection et la séquestration du fer est maintenant connu : c'est l'IL-6 qui est produit par les macrophages en réponse à l'inflammation (Nemeth *et al.* 2003). L'IL-6 sécrétée par les macrophages augmente l'expression de l'hepcidine par les hépatocytes ce qui a pour effet de diminuer l'expression de NRAMP2 dans le duodénum (Yamaji *et al.* 2004) et de réduire la libération de fer via la ferroportine (Nemeth *et al.* 2004) par les macrophages qui recyclent les érythrocytes. Ces deux effets combinés permettent de rapidement diminuer la concentration de fer circulant puisque, comme nous l'avons vu précédemment, la réserve de fer lié à la transferrine ne représente que 3 mg, comparativement aux 20 mg transitant à chaque jour dans les macrophages (Hentze *et al.* 2004).

Ceci démontre donc l'importance de la disponibilité du fer dans l'organisme lors de la réponse aux infections et l'existence de mécanismes qui ont évolué dans le sens du contrôle des pathogènes. Ce contexte souligne d'autant plus l'importance du rôle de NRAMP1 qui contribue directement à priver les pathogènes de métaux qui leur sont essentiels.

Figure 4 : Intégration de l'hepcidine dans le métabolisme du fer



Adapté de (Hentze *et al.* 2004)

### 1.3.3 Acquisition du fer par *M. tuberculosis*

Les mycobactéries sont dépendantes du fer et du manganèse pour leur croissance et pour la détoxification du milieu adverse qu'est le phagosome. Il est donc essentiel pour le pathogène d'acquérir les métaux dont NRAMP1 et la réponse systémique tentent de le priver. La niche occupée par *M. tuberculosis* dans l'hôte, le phagosome, lui permet d'avoir accès autant au fer exogène qu'endogène. Pour avoir accès à ces ressources et pour la survie de *M. tuberculosis* à l'intérieur du macrophage, la production de sidérophores est essentielle (De Voss *et al.* 2000). D'ailleurs, un des premiers traitements contre la tuberculose (1946) l'acide p-aminosalicytique (PAS) inhibe la synthèse de mycobactine, un sidérophore de *M. tuberculosis* (Ratledge 2004). L'accès à la réserve (pool) labile cytoplasmique de fer endogène (Olakanmi *et al.* 2002) assure un approvisionnement constant, sinon augmenté, de fer au bacille malgré la séquestration du

fer dans les macrophages. Il existe effectivement un équilibre entre cette réserve utilisée pour les fonction de la cellule et la ferritine, lieu d'entreposage du fer dans le macrophage (Ponka *et al.* 1998), qui est ainsi accessible au pathogène.

Outre cette source endogène, il est également bien connu que le phagosome de *M. tuberculosis* garde un accès à une source exogène de fer via la transferrine. Le phagosome de *M. tuberculosis* effectue des échanges constants avec les endosomes du cycle de la transferrine (Clemens et Horwitz 1995; Sturgill-Koszycki *et al.* 1996). Ce mode d'acquisition du fer est diminué par l'activation du macrophage par l'IFN $\gamma$  qui réduit de 50% l'acquisition du fer via la transferrine (Olayanmi *et al.* 2002) en diminuant notamment l'expression du récepteur à la transferrine (Kim et Ponka 2000). Donc l'IFN $\gamma$ , tout augmentant directement les capacités mycobactéricides du macrophage (Govoni *et al.* 1997; Casanova et Abel 2002; MacMicking *et al.* 2003) augmente également la capacité mycobactériostatique du macrophage en limitant l'accessibilité au fer.

Dans les poumons, lieu de prédilection pour *M. tuberculosis*, la lactoferrine constitue une autre source importante de fer pour le pathogène. La lactoferrine est une protéine de 80 kDa de la famille de la transferrine qui est sécrétée par les cellules glandulaires épithéliales, qui fait partie de l'arsenal bactéricide des granules secondaires des neutrophiles matures et qui est retrouvée en grande quantité dans le colostrum (Ward et Conneely 2004) (d'où Lactoferrine). La lactoferrine est donc un autre exemple de molécule impliquée dans l'homéostasie du fer qui est également impliquée dans la réponse aux infections. Le phénotype de susceptibilité du knock-out murin de la  $\beta$ -2 microglobuline à l'infection par *M. tuberculosis* est corrigé par la séquestration du fer par la lactoferrine (Schaible *et al.* 2002).

Un tel effet positif de la lactoferrine s'explique par son action pléiotropique. La dégranulation des neutrophiles *in vivo* augmente localement la concentration de lactoferrine (Masson *et al.* 1969) qui exerce son action en séquestrant le fer et en ayant un effet bactéricide direct sur le pathogène (Singh *et al.* 2000). Cette bactéricidie est notamment causée par la liaison du peptide sur le groupement phosphate du lipide A du LPS (Brandenburg *et al.* 2001). Malgré toutes ces indications de la participation de la

lactoferrine aux défenses de l'hôte, une étude récente vient cependant confirmer que *M. tuberculosis* est néanmoins en mesure d'acquérir une quantité importante de fer provenant de la lactoferrine dans le phagosome de macrophages humains (Olakanmi *et al.* 2004), démontrant encore une fois l'adaptation de *M. tuberculosis* à son hôte.

## **1.4 Famille NRAMP**

### **1.4.1 NRAMP1 dans l'immunité naturelle des mammifères**

Le modèle murin est le modèle de choix pour l'étude génétique et immunologique de plusieurs maladies affectant l'homme. Cette approche a permis de décrire les différents mécanismes de résistance génétique, de pathogénèse et de résistance en utilisant la souris comme outil pour mieux comprendre la biologie humaine. Nous allons maintenant aborder l'implication de NRAMP1 dans l'immunité naturelle d'autres mammifères qui peuvent constituer un réservoir important d'agents pathogènes.

Chez les bovins, NRAMP1 est associé à la susceptibilité à *Brucella abortus* (Feng *et al.* 1996). Ce pathogène intracellulaire facultatif cause la brucellose, maladie responsable de pertes économiques annuelles chiffrées à 35 millions de dollars aux États-Unis avant la fin des années 1990. Bien que la brucellose soit éradiquée en Amérique du nord, elle est encore présente dans plus de 140 pays, principalement des pays en voie de développement (WHO fact sheet). L'infection bovine cause des zoonoses suite à la consommation de lait contaminé ou par proximité avec un animal infecté. Des macrophages de bovins résistants démontrent une activation et une capacité à contrôler la réplication intracellulaire de *B. abortus* supérieures à celles des macrophages de bovins sensibles (Harmon *et al.* 1989; Price *et al.* 1990), et ce de manière semblable à la différence observée chez la souris pour *S. typhimurium*. Le clonage puis le séquençage du gène NRAMP1 bovin a permis de caractériser puis d'associer des polymorphismes en 3' de l'ARNm avec la susceptibilité à *B. abortus* (Horin *et al.* 1999).

La recherche de gènes de susceptibilité chez le poulet est également motivée par des intérêts économiques et de santé publique. La sélection de gènes pouvant amplifier la

résistance naturelle de certaines lignées de poulets commerciaux à *Salmonella* est un des axes de cette recherche tant pour la santé des élevages (*S. gallinarum*) que celle du consommateur (*S. typhimurium*) (Wigley 2004). L'association entre *NRAMP1* et la susceptibilité aux infections à *Salmonella* a pu être démontrée dans certaines lignées de poulets (Hu *et al.* 1997). Tout comme chez l'homme, cette susceptibilité est complexe, *NRAMP1* ne pouvant expliquer à elle seule la variabilité de résistance dans toutes les lignées de poulets. Cette susceptibilité varie selon l'organe utilisé comme indicateur de l'infection, la voie d'inoculation et l'âge des poulets (Girard-Santosuosso *et al.* 1998; Girard-Santosuosso *et al.* 2002; Beaumont *et al.* 2003; Kramer *et al.* 2003).

Les infections à *Leishmania infantum* causent des zoonoses à *Leishmania* dans les pays d'Europe du sud où le chien constitue le principal réservoir de *L. infantum*. Tout comme pour la tuberculose, la co-infection avec le VIH exacerbe les leishmanioses (Molina *et al.* 2003), ces dernières pouvant même augmenter la réplication du VIH dans les macrophages humains (Zhao *et al.* 2004). Les lignées murines *Lsh* susceptibles à *L. donovani* étant également susceptibles à *L. infantum* (Leclercq *et al.* 1996), *NRAMP1* constituait donc un candidat de gène prédisposant à l'infection. Ainsi, comme chez d'autres mammifères, la susceptibilité à l'infection à *L. infantum* chez le chien a été associée à des polymorphismes du gène *NRAMP1* (Altet *et al.* 2002).

La protéine *NRAMP1* joue donc globalement un rôle chez les mammifères dans la résistance à différents pathogènes intracellulaires. Il apparaît que l'effet du gène n'est pas majeur (au sens génétique) dans bien des cas. Cet effet doit toutefois être vu comme une contribution aux défenses naturelles de l'hôte qui sont complexes. Ces défenses ont bénéficié de millions d'années d'évolution pour s'adapter et démontrer une plasticité permettant au corps de répondre aux organismes pathogènes.

#### **1.4.2 Paralogie *Nramp* chez les vertébrés**

Deux grands groupes de protéines *NRAMP* sont présents chez les eucaryotes. Le premier, dénommé prototype, est retrouvé principalement dans les organismes unicellulaires et est à l'origine du deuxième groupe, l'archétype, qui est retrouvé chez les eucaryotes

supérieurs. Tandis que les eucaryotes supérieurs n'ont gardé que l'archétype, certains invertébrés et protistes ont conservé les deux groupes (Richer *et al.* 2003). Le gène codant pour l'archétype a acquis un intron après sa duplication du prototype, intron qui est conservé dans le gène *DdNR2* de l'amibe *Dyctostelium discoïdum* et les gènes *NRAMP* de l'homme (Richer *et al.* 2004).

Chez les vertébrés le gène codant pour l'archétype a subi une duplication donnant naissance aux deux groupes de protéines décrits précédemment, *NRAMP1* et *NRAMP2*. Cette duplication a probablement eu lieu avant la radiation des mammifères puisque la phylogénie indique que le groupe de gènes *NRAMP1* n'est retrouvé que chez ces derniers tandis qu'un seul groupe *NRAMP* est retrouvé chez les poissons et proto-vertébrés (Burge *et al.* 2004).

En se basant sur les données d'expression des protéines *NRAMP1* et *NRAMP2* chez les mammifères, il est logique d'interpréter cette duplication comme un moyen de dégager *NRAMP1* d'un rôle possible dans l'homéostasie du fer pour être intégré dans l'immunité naturelle et spécifiquement régulé par celle-ci. Comme nous avons pu observer, cette nouvelle fonction n'est certainement pas le résultat d'une modification profonde de la fonction de base de *NRAMP1*, qui transporte comme tous les autres membres de la famille *NRAMP/MntH* des métaux divalents et des protons dans le cytoplasme de la cellule.

La différence se situe plutôt dans la régulation de l'expression de *NRAMP1*. Le promoteur de cette dernière, affranchi du besoin de répondre à la concentration de fer dans l'organisme, a acquis une régulation typiquement myéloïde (Roig *et al.* 2002). Il apparaît donc intéressant d'étudier les mécanismes contrôlant l'expression de *NRAMP1* et de déterminer dans quelle mesure ils relèvent de la myélopoïèse ou de l'intégration dans la réponse innée de l'hôte visant à limiter l'accès des pathogènes à des ressources vitales à leur survie.

## ***1.5 Myélopoïèse***

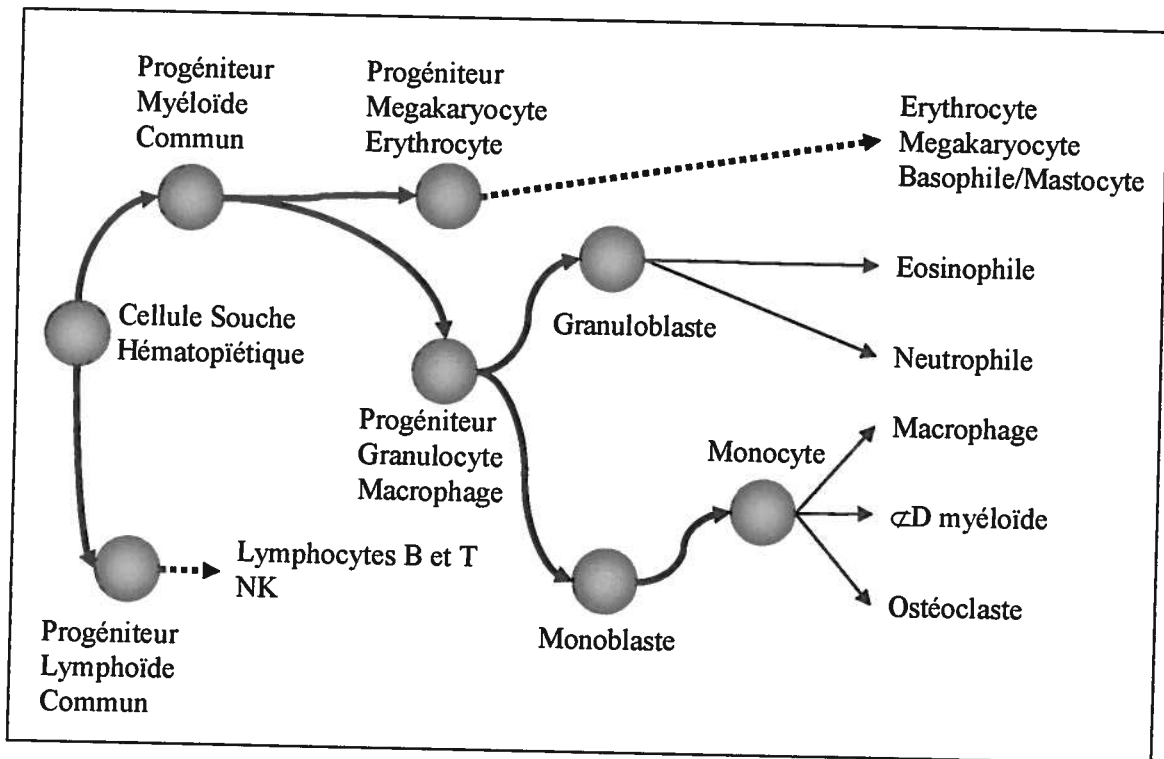
La myélopoïèse permet la génération de monocytes/macrophages et de granulocytes et s'intègre de manière plus générale dans l'hématopoïèse qui permet de produire les cellules du tissu sanguin. Cette production cellulaire est assurée par la survie, la prolifération et la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques pluripotents (Barreda *et al.* 2004) qui sont situés dans le foie foetal lors du développement pour ensuite être localisés dans la moelle osseuse chez les adultes (Gottgens 2004). Ces cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des précurseurs des lymphocytes B et T, des cellules NK, des érythrocytes, des mégacaryocytes (produisant les plaquettes), des ostéoclastes, des cellules dendritiques, des granulocytes, neutrophiles, basophiles, éosinophiles et des monocytes/macrophages.

Dans la moelle osseuse, les CSH peuvent se différencier en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ou en progéniteurs myéloïdes communs (PMC). À cette étape, il y a une nouvelle subdivision des progéniteurs en progéniteurs mégacaryocyte érythrocyte (MEP) et en progéniteurs macrophage granulocyte (GMP) (Friedman 2002). Les GMP sont caractérisés par l'expression de CD34, récepteur de la molécule d'adhésion cellulaire L-sélectine, et des récepteurs FcγRII/III (Akashi *et al.* 2000; Traver *et al.* 2001), récepteurs de la partie invariante des immunoglobulines d'isotype IgG.

Durant la différenciation en granuloblaste puis en neutrophile les GMP vont exprimer à leur surface des marqueurs de différenciation précoces CD33, CD13, le récepteur du G-CSF (CD114) puis synthétiser graduellement les composantes des granules primaires, secondaires (notamment la lactoferrine), tertiaires (Friedman 2002) et finalement des vésicules sécrétoires (Borregaard et Cowland 1997). Plutôt que de constituer des entités bien homogènes, ces différents types de granules présentent en fait un continuum caractérisé par une concentration variable de marqueurs (Borregaard et Cowland 1997). Dans cet esprit, NRAMP1 est associé principalement aux granules tertiaires qui sont également positifs pour la gélatinase, la lactoferrine et les ATPases vacuolaires (Borregaard et Cowland 1997; Canonne-Hergaux *et al.* 2002).

À l'opposé de la différenciation des GMP en granulocytes, la différenciation en monoblastes puis en monocytes/macrophages est caractérisée par l'apparition de marqueurs précoces comme le récepteur du M-CSF (macrophage-colony stimulating factor, CD115), les récepteurs Fc $\gamma$ RII/III et de marqueurs monocytaires plus tardifs comme CD14 qui est le co-récepteur de TLR4 pour le LPS (Friedman 2002; Roig *et al.* 2002). En plus de ces marqueurs spécifiques pour l'une ou l'autre des voies de différenciation des GMP, d'autres marqueurs sont communs aux deux lignées comme CD11b.

Figure 5 : Myélopoïèse



Deux écoles de pensée tentent d'expliquer ce qui détermine le type cellulaire qui sera produit par un progéniteur pluripotent. Le modèle « stochastique » est un modèle aléatoire basé sur les lois de la probabilité et selon lequel un progéniteur a une certaine probabilité de se régénérer ou de se différencier. Toujours selon ce modèle, les probabilités peuvent être influencées par la présence de facteurs exogènes, notamment par les facteurs de croissance (Till *et al.* 1964; Suda *et al.* 1984). À l'opposé, le modèle « déterministe » prétend que les progéniteurs ont un potentiel prédéterminé. Dans ce cas, les facteurs de croissance permettent soit de supporter la survie de progéniteurs lors de leur



différenciation (Nicola et Johnson 1982), soit de déterminer quel sera le prochain stade de différenciation (Daniel *et al.* 1989), cette double possibilité correspondant à une division au sein même de l'école déterministe. Un modèle plus récent, le modèle « chiaroscuro », propose même que la possibilité de différenciation des progéniteurs varie en fonction de la période du cycle cellulaire durant laquelle les récepteurs et les facteurs de transcription sont exprimés, modifiant ainsi le devenir potentiel des progéniteurs (Quesenberry *et al.* 2002).

Plusieurs résultats expérimentaux soulignent que « l'arbre de différenciation » n'est pas un processus linéaire mais bien un continuum (Mezey *et al.* 2000; Anderson *et al.* 2001) dans lequel les cellules ont un certain potentiel de « dédifférenciation » qui diminue avec le stade d'engagement vers un type cellulaire mature (Kirkland 2004) et dans lequel également les cellules gardent un certain potentiel de transdifférenciation (Xie *et al.* 2004). Dans ce concept, les CSF (Colony-Stimulating Factor) jouent un rôle attracteur, ayant la capacité d'« attirer » les progéniteurs vers un type cellulaire donné (Kirkland 2004). Ainsi, indépendamment du modèle utilisé pour décrire l'hématopoïèse, l'importance primordiale des facteurs de croissance est toujours prise en considération. Nous allons donc décrire les principaux facteurs pouvant influencer la myélopoïèse.

### **1.5.1 Régulation de la myélopoïèse par les CSF**

Les CSF agissent sur les différents types de progéniteurs et contribuent à leur survie, leur renouvellement et, aussi, leur différenciation.

#### **1.5.1.1 IL-3**

L'IL-3, ou multi-CSF, agit comme facteur de croissance et de survie (Zheng *et al.* 2002) pour un large spectre de cellules impliquées dans l'hématopoïèse (CSH, PMC, MEP, GMP) (Martinez-Moczygamba et Huston 2003; Barreda *et al.* 2004). Ce large spectre d'action est démontré *in vivo* par l'injection d'IL-3 qui augmente le nombre de d'éosinophiles, de neutrophiles, de mastocytes, de monocytes, d'érythrocytes et de mégacaryocytes (Metcalf *et al.* 1986). L'IL-3 agit donc sur un large spectre de

progéniteurs et recoupe l'action d'autres CSF plus spécifiques, notamment le GM-CSF (Koike *et al.* 1987).

Le récepteur de l'IL-3 et celui du GM-CSF sont composés de deux chaînes, la chaîne  $\alpha$  (CD123 pour le récepteur de l'IL-3 et CD116 pour le récepteur du GM-CSF) et la chaîne  $\beta$ . Les chaînes  $\alpha$  du récepteur de l'IL-3 et du GM-CSF possèdent une origine évolutive commune récente (Kosugi *et al.* 1995). C'est la chaîne  $\alpha$  qui est impliquée dans la liaison au substrat, soit le GM-CSF, soit l'IL-3 (Gearing *et al.* 1989). Chez l'humain, ces deux récepteurs partagent également la même chaîne  $\beta$  qui permet la signalisation intracellulaire (Hayashida *et al.* 1990) et augmente l'affinité de la liaison de la chaîne  $\alpha$  avec son substrat. Tel qu'attendu, le knock-out de l'IL-3Ra ne répond plus à l'IL-3 et répond au GM-CSF tandis que le knock-out des deux chaînes  $\beta$  murines (à l'opposé de l'homme qui n'en possède qu'une) affecte la réponse à l'IL-3 et au GM-CSF (Nishinakamura *et al.* 1996).

#### 1.5.1.2 GM-CSF

Le GM-CSF agit sur les MEP, GMP, granulocytes et monocytes. Le niveau d'expression du récepteur au GM-CSF augmente avec l'état d'avancement de la différenciation cellulaire en granulocyte ou en macrophage (DiPersio *et al.* 1988). À l'opposé, la différenciation en érythrocyte ou en mégacaryocyte amène une diminution de l'expression du récepteur au GM-CSF (Militi *et al.* 2000). En plus de favoriser la différenciation de granulocytes et de monocytes, le GM-CSF favorise la croissance cellulaire et possède une activité anti-apoptotique (Williams *et al.* 1990). Les études de stimulation par le GM-CSF *in vitro* ont vite démontré la complexité et l'importance des interrelations entre le GM-CSF, le M-CSF et le G-CSF. Alors que, seul, le GM-CSF favorise davantage la formation de granuloblastes, une faible quantité de GM-CSF en présence de M-CSF favorise la formation de myéloblaste. En revanche, une plus forte concentration de GM-CSF antagonise l'action du M-CSF (Metcalf et Nicola 1992).

Outre son action sur les progéniteurs myéloïdes, le GM-CSF a une influence directe sur l'activité bactéricide des cellules myéloïdes (Nemunaitis *et al.* 1998). Une forte

concentration de cette cytokine est d'ailleurs retrouvée dans les poumons d'où la protéine fut initialement isolée (Burgess *et al.* 1977). Plus récemment, il a été démontré que l'infection des macrophages par des mycobactéries pathogènes entraîne une plus faible activation de la production du GM-CSF que l'infection par des mycobactéries non pathogènes (Beltan *et al.* 2000). D'autres pathogènes modulent également l'expression du GM-CSF, notamment *S. typhimurium* et *Legionella pneumophila* (Yamamoto *et al.* 1996). L'administration de GM-CSF à des souris Nramp1<sup>+</sup> infectées par *S. typhimurium* augmente la survie des souris (Morrissey et Charrier 1990), démontrant un rôle positif direct du GM-CSF pour l'hôte lors de l'infection.

### 1.5.1.3 M-CSF

Comme son nom l'indique le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) favorise la croissance, la survie et la différenciation des Monocytes/Macrophages et également des ostéoclastes (Stanley *et al.* 1997). En plus de la modulation de l'activité du M-CSF par le GM-CSF dont nous avons déjà parlé, l'IL-6, qui induit l'activation intracellulaire de NF-IL6 (C/EBP $\beta$ ), peut également coopérer avec le M-CSF pour favoriser le développement des macrophages (Bot *et al.* 1989). La production de M-CSF par les macrophages est stimulée par l'IFN $\gamma$  (Oster *et al.* 1988), et le GM-CSF (Horiguchi *et al.* 1986). Localement, le M-CSF augmente les capacités bactéricides des macrophages (Karbassi *et al.* 1987; Ralph et Nakoinz 1987) en augmentant entre autres la production de ROI (Wing *et al.* 1985; Takada *et al.* 2000). Le récepteur du M-CSF (CD115), une protéine membranaire intégrale de 140 à 150 kDa, est exprimé principalement dans les cellules de la lignée monocyte/macrophage (Guilbert et Stanley 1980) et possède un domaine intracellulaire tyrosine kinase qui est phosphorylé suite à la dimérisation du récepteur causée par la liaison du G-CSF (Barreda *et al.* 2004).

### 1.5.1.4 G-CSF

Le dernier CSF, le G-CSF, agit quant à lui sur les neutrophiles et leurs précurseurs favorisant leur survie, leur prolifération et leur différenciation (Barreda *et al.* 2004). Le knock-out du G-CSF murin ne possède que 20-30% du nombre normal de granulocytes,

que 50% du nombre de précurseurs granulopoïétique et montre une sensibilité à l'infection à *Listeria monocytogenes* (Lieschke *et al.* 1994). L'injection de G-CSF dans ces souris rétablit la quantité normale de granulocytes en 4 jours (Lieschke *et al.* 1994). Ce développement rapide et important des granulocytes survient également lors de l'inflammation qui peut augmenter d'un facteur 10 le nombre de neutrophiles circulants (Barreda *et al.* 2004). *In vivo*, l'inflammation et l'infection entraînent une augmentation significative de la concentration de G-CSF dans les tissus et dans le sang (Metcalf 1987). Les macrophages constituent la principale source du G-CSF produit dans ces conditions, notamment en réponse au LPS (Vellenga *et al.* 1988), à *M. avium* (Fattorini *et al.* 1994) et à l'IFN $\gamma$  (Lu *et al.* 1988). Le récepteur du G-CSF (CD114), une protéine de 130-150 kDa, est exprimé principalement sur les progéniteurs granulocytaires et sur les neutrophiles matures (Barreda *et al.* 2004). Tout comme le récepteur de M-CSF, la liaison du G-CSF à son récepteur entraîne l'homodimérisation de ce dernier ce qui provoque la formation d'un tétramère composé de deux molécules de G-CSF et de deux récepteurs (Aritomi *et al.* 1999). Cette liaison des récepteurs déclenche une signalisation intracellulaire activant notamment les protéines STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription), STAT3 et STAT5 (Barreda *et al.* 2004).

### **1.5.2 HL-60 comme modèle de progéniteur myéloïde**

Des lignées myéloïdes immortalisées isolées de patients souffrant de leucémies sont couramment utilisées comme modèles de différenciation myéloïde. Nous avons déjà décrit la différenciation de la lignée promyélocytaire HL-60 qui est utilisée depuis 1977 (Collins *et al.* 1977) et qui possède une bipotentialité monocytaire/granulocyttaire, ce qui la place approximativement au stade de développement des GMP (Collins 1987). Environ 5% des cellules HL-60 en culture se différencient spontanément (Collins 1987). Les CSF vont agir sur cette lignée pré-myéloïde en stimulant une différenciation de type éosinophilique pour le GM-CSF (Breitman *et al.* 1980), tandis que le G-CSF semble avoir un effet plus marqué lors des événements précoces de différenciation granulocyttaire (Elias et Van Epps 1988). Lors de la différenciation monocytaire terminale, le M-CSF semble impliqué principalement dans la survie cellulaire (Vassiliadis et Guilbert 1991).

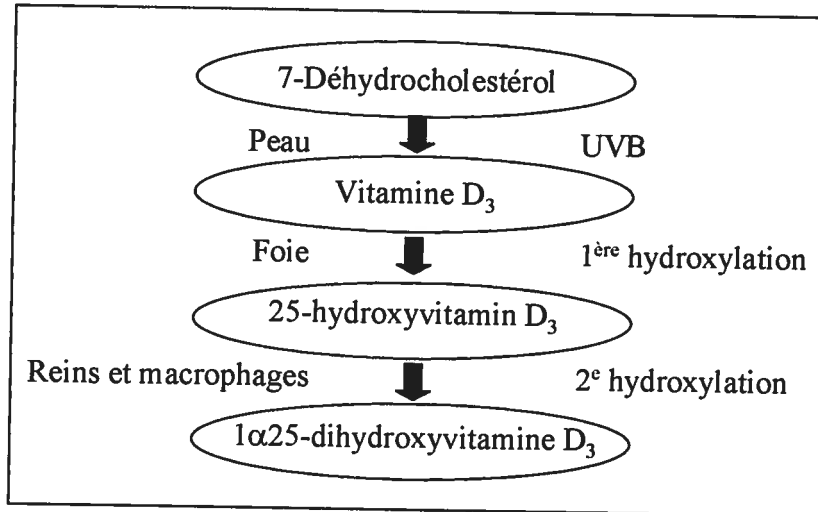
La différenciation granulocytaire est induite par des composés polaires et planaires, comme le DMSO (Collins *et al.* 1978), ou par d'autres agents tel l'ATRA (Breitman *et al.* 1980), agents qui permettent d'augmenter la différenciation spontanée de la lignée cellulaire. Cette différenciation spontanée peut même être stimulée par une variation thermique (Richards *et al.* 1988). La différenciation monocyttaire est induite par le PMA (Mendelsohn *et al.* 1980), la VD (Tanaka *et al.* 1982) ou même un milieu conditionné de lymphocytes (Elias *et al.* 1980). L'ATRA en faible concentration agit en synergie, notamment avec l'IFN $\gamma$ , pour induire une différenciation de type monocyttaire (Hemmi et Breitman 1987) plutôt que de favoriser la différenciation granulocytaire.

### **1.5.3 Régulation de la myélopoïèse par la forme active de la vitamine D<sub>3</sub>**

#### **1.5.3.1 Synthèse de la forme active de la vitamine D<sub>3</sub>**

En plus de son rôle dans la régulation de la calcémie, cette hormone joue un rôle important dans la myélopoïèse. Le précurseur de la vitamine D<sub>3</sub> est produit suite à l'exposition de la peau aux rayons UVB (ultraviolet-B) qui catalysent la photolyse du 7-dehydrocholestérol. Le produit de cette catalyse est par la suite hydroxylé en 25-Hydroxivitamine D<sub>3</sub> dans le foie. À cette étape, l'hormone est toujours inactive et devra subir une hydroxylation supplémentaire afin de prendre la forme active de 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (Hayes *et al.* 2003). Cette dernière transformation est effectuée dans les reins afin de maintenir la concentration sérique de VD entre 10<sup>-10</sup> et 10<sup>-11</sup> M (Caldas *et al.* 1978). Cette régulation stricte permet de contrôler la calcémie mais n'est probablement pas suffisante pour avoir un impact sur la régulation des fonctions du macrophage pour lesquelles une concentration entre 10<sup>-8</sup> et 10<sup>-9</sup> M est nécessaire. Une telle concentration est cependant atteinte localement grâce à la VD qui est produite par les macrophages, créant un microenvironnement permettant de moduler la réponse immunitaire sans affecter la régulation systémique du calcium.

Figure 6 : Synthèse de la forme active de la vitamine D<sub>3</sub>



### 1.5.3.2 La 1 $\alpha$ 25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> : hormone et cytokine

Une carence en calcium stimule la sécrétion de l'hormone parathyroïde (PTH) va être stimulée, permettant d'augmenter la synthèse de la forme active de la vitamine D<sub>3</sub> par les reins en augmentant l'expression de la 1 $\alpha$ -hydroxylase (Omdahl *et al.* 1972). La PTH permet également de diminuer la dégradation de la VD en diminuant l'activité de la 24-hydroxylase (Brown *et al.* 1999). L'augmentation de la concentration sérique de la VD augmente l'absorption intestinale du calcium (Li *et al.* 1998), ce qui constitue le principal effet de la VD sur la calcémie. La VD stimule également la différenciation d'ostéoclastes (Takahashi *et al.* 1988), quoique la pertinence physiologique de ce processus soit actuellement remise en question (Suda *et al.* 2003).

Les premiers effets de la VD *in vivo* sur le système hématopoïétique furent décrits suite à l'observation que les macrophages de patients souffrant de sarcoïdose produisaient de la VD (Adams *et al.* 1983; Adams *et al.* 1985). En parallèle, la différenciation induite par la VD de lignées cellulaires, notamment la lignée HL-60, en macrophages était décrite (Abe *et al.* 1981) de même que la différenciation de progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse cultivés *in vitro*. Dans ce modèle de différenciation *in vitro* la VD augmente la production de macrophages et diminue la production de neutrophiles (McCarthy *et al.* 1983). La différenciation de cellules CD34<sup>+</sup> de cordon ombilical par la VD favorise également la production de macrophages (Grande *et al.* 2002). La VD bloque également

la différenciation des cellules dendritiques (Griffin *et al.* 2000), amenant même une certaine dé-différenciation de ce type cellulaire (Piemonti *et al.* 2000; Gauzzi *et al.* 2005). *In vivo*, cette inhibition peut être un des mécanismes réduisant la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T en réponse à la VD (Penna et Adorini 2000). Une faible concentration de VD peut favoriser *in vivo* le développement de macrophages à l'extérieur des microenvironnements à concentration élevée de VD par synergie avec d'autres cytokines et facteurs de croissance, notamment l'IL-6 (Duits *et al.* 1992) et le GM-CSF (James *et al.* 1997). En résumé, la VD favorise la différenciation des macrophages, et ce depuis les progéniteurs de la moelle osseuse, et inhibe la différenciation des granulocytes et des cellules dendritiques.

En plus de favoriser le développement de monocytes/macrophages, la VD agit de manière autocrine sur les macrophages matures pour stimuler leurs fonctions, spécialement leur potentiel mycobactéricide (Rook *et al.* 1986). Cette mycobactéricidie résulte de l'augmentation du potentiel phagocytaire des macrophages (Chandra *et al.* 2004) et de l'augmentation de la production de NO (Kawase *et al.* 1998; Rockett *et al.* 1998). Ce contrôle du potentiel mycobactéricide est probablement important *in vivo* puisqu'une augmentation locale de la concentration de VD a été démontrée lors de l'infection à *M. tuberculosis* (Barnes *et al.* 1989). Cette concentration locale élevée semble également favoriser la création du granulome, structure importante pour contenir certaines infections et dont nous avons déjà parlé (Rook 1988). Rook a proposé en 1988 un modèle d'infection dans lequel des macrophages activés par *M. tuberculosis* produisent de la VD qui les active et selon lequel cette production de VD est augmentée suite à la stimulation des macrophages par l'IFN $\gamma$ . Cette augmentation est causée directement par l'induction de la production de la D-1- $\alpha$ -hydroxylase par l'IFN $\gamma$  (Overbergh *et al.* 2000).

L'induction de la différenciation par la VD de cellules leucémiques ouvre une possibilité de thérapie de différenciation, l'idée étant d'outrepasser le blocage de la maturation des cellules leucémiques. Des analogues pharmacologiques (voir section 1.4.5.2) plus puissants que la VD permettant d'induire la différenciation tout en limitant les effets sur la calcémie ont donc rapidement été développés (Koeffler *et al.* 1984). Ce principe de thérapie peut également être appliqué aux infections pour lesquelles la VD pourrait

permettre de moduler la réponse immunitaire afin d'augmenter l'immunité naturelle de l'hôte. Ces analogues ont d'ailleurs été utilisés avec succès dans le traitement du psoriasis (Bouillon *et al.* 1995), une maladie auto-immunitaire.

### **1.5.4 Contrôle transcriptionnel par la 1 $\alpha$ 25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>**

#### **1.5.4.1 VDR(s)**

L'hormone stéroïdienne VD se lie à un récepteur cytoplasmique spécifique, le VDR. La liaison de la VD à son récepteur entraîne un changement de conformation de ce dernier qui migre rapidement au noyau via les microtubules (Kamimura *et al.* 1995). Dans le noyau, le VDR forme un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) ce qui permet au récepteur de se lier à l'ADN dans le sillon majeur via une structure en doigt de zinc (Shaffer et Gewirth 2002) sur des sites de réponse à la vitamine D (VDRE) (Brown *et al.* 1999). Le VDRE est composé d'un tandem répété (AGGTCA N<sub>3</sub> AGGTCA) dont l'espacement entre les deux répétitions confère la spécificité à l'hétérodimère RXR-VDR par rapport à d'autres membres de la famille des récepteurs stéroïdiens (Latchman 2004). Bien que l'action majoritaire du VDR soit effectuée en hétérodimère avec RXR, le VDR peut également agir en tant qu'homodimère (Kahlen et Carlberg 1994; Takeshita *et al.* 2000). La liaison de la VD permet également au VDR d'adopter une conformation active en repositionnant son domaine d'activation qui recrute alors des co-activateurs qui vont agir en modifiant la chromatine ou en recrutant directement la machinerie de transcription basale (Rachez et Freedman 2000).

En plus des effets dits génomiques causés par le VDR, la VD cause également des effets dit non-génomiques. Ces derniers sont caractérisés par une réponse trop rapide pour être le résultat d'une modification de l'activité transcriptionnelle et ont lieu même dans des ostéoblastes de souris knock-out pour le VDR (Li *et al.* 1998). Ces effets incluent une modification du métabolisme des phosphoinositides, une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium et une activation de la PKC (Brown *et al.* 1999). L'annexine II est identifiée par un groupe comme le récepteur membranaire causant ces effets (Baran *et al.* 2000). Encore peu d'implications physiologiques de l'activation de ce



récepteur sont connues et, dans certaines conditions, les effets non génomiques pourraient être causés par une autre voie (Schwartz *et al.* 2002). Les effets non génomiques semblent avoir un rôle important à jouer dans la photoprotection face aux rayons UV (Wong *et al.* 2004).

#### 1.5.4.2 Analogues de la VD

Au-delà de 400 analogues structuraux de la VD ont été synthétisés chimiquement dans le but de servir éventuellement d'agents thérapeutiques ou pour mieux disséquer les mécanismes d'action de la VD (Norman et Silva 2001). Certains de ces analogues possèdent un pouvoir de différenciation et d'inhibition de croissance accrus avec des effets moindres sur la calcémie (Peleg *et al.* 1995). Plusieurs de ces composés, comme le KH1060 (KH), impose une conformation non-flexible à la VD à la position 20 de la chaîne aliphatique (20-epi). Les structures cristallographiques du VDR lié à la VD ou au KH possèdent peu de différences, et il n'y a pas ou peu d'influence sur la spécificité des ligands. Toutefois, le complexe formé par le KH possède une stabilité et une demi-vie plus élevées permettant de créer des complexes plus actifs avec des co-activateurs comme DRIP (vitamin D receptor-interacting protein) (Tocchini-Valentini *et al.* 2001). Ce dernier complexe de co-activation (DRIP) est associé avec le VDR et est responsable de l'augmentation de l'expression de p21<sup>waf</sup>, un inhibiteur du cycle de division cellulaire central ce qui a pour effet de limiter la prolifération, ce dont nous reparlerons plus tard (Yang et Freedman 1999).

Certains analogues bloqués en position 6-s-cis, comme le JN, lient faiblement le VDR mais possèdent une conformation qui leur permet d'interagir avec le récepteur membranaire (Norman *et al.* 1997). À l'opposé, HL est un antagoniste de la réponse rapide (membranaire) mais ne modifie pas la réponse par le VDR (Zanello et Norman 1997). Cette plasticité de conformation de la VD qui est exploitée par les chimistes vient en fait de la nécessité pour l'hormone *in vivo* de lier trois récepteurs différents (la protéine plasmique liant la VD, le récepteur membranaire et le VDR) et ce dans trois conformations actives différentes (Norman et Silva 2001).

### 1.5.4.3 Différenciation terminale

Parmi les effets clés de la VD sur le modèle cellulaire HL-60, nous observons une diminution de l'expression de c-myc (Reitsma *et al.* 1983) et une augmentation de p21<sup>waf</sup> (Liu *et al.* 1996) et de p27<sup>kip</sup> (Wang *et al.* 1996). L'expression ectopique de ces deux derniers inhibiteurs de cycle cellulaire permet d'induire la différenciation terminale de la lignée cellulaire myéloïde U-937 (Liu *et al.* 1996), tandis que l'expression de c-myc est associée à la prolifération cellulaire. L'inhibition de l'expression de c-myc est causée principalement par l'augmentation de la liaison de HOXB4 dans le premier intron de c-myc (Pan et Simpson 1999; Pan et Simpson 2001). En ce qui concerne l'expression de p21<sup>waf</sup>, un site de liaison du VDR est présent dans le promoteur permettant ainsi une régulation directe par la VD (Liu *et al.* 1996; Muto *et al.* 1999). Le promoteur de p27<sup>kip</sup> ne possède pas quant à lui d'éléments VDRE, l'activation par la VD étant plutôt relayée par l'interaction des facteurs de transcription Sp1 et NF-Y (Inoue *et al.* 1999). Dernièrement, il a été démontré que la vitamine D augmentait directement l'expression de l'activateur p35 des kinases dépendantes des cyclines et indirectement, en accroissant l'expression du facteur de transcription Egr1, proposant ainsi un autre mécanisme pour hausser l'expression de p27<sup>kip</sup> (Chen *et al.* 2004).

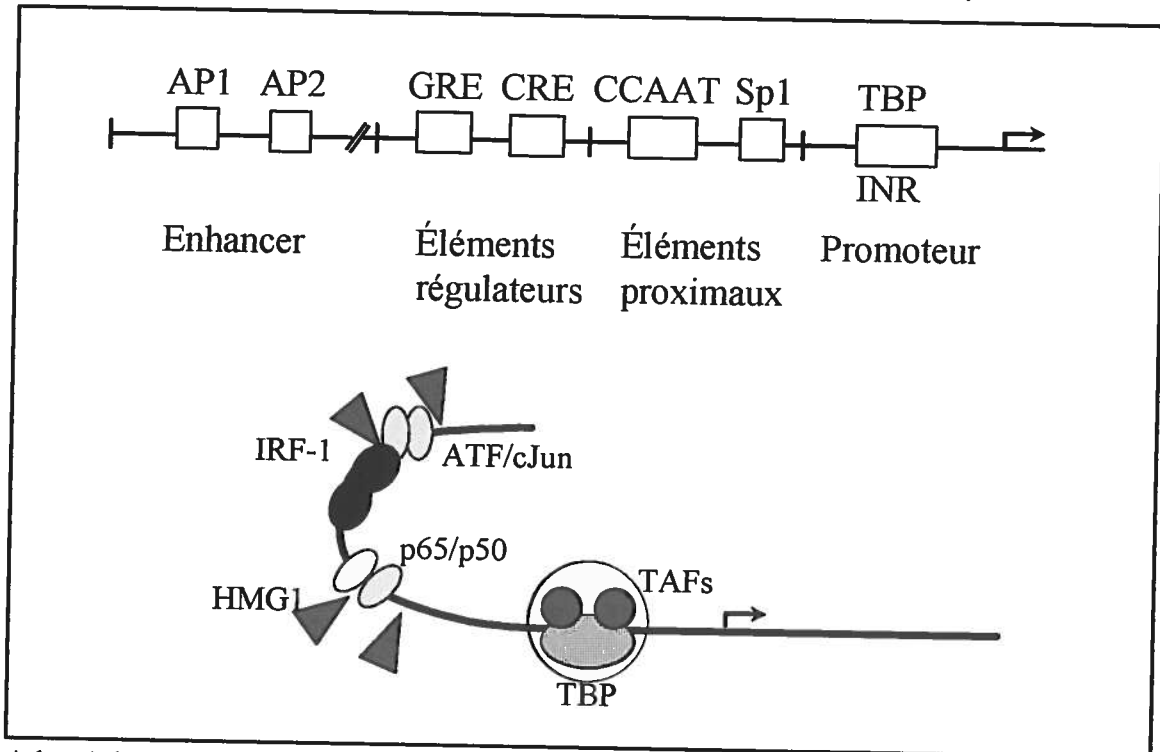
La stimulation par la VD permet ainsi d'arrêter la division cellulaire en phase G1 tout en diminuant l'expression de c-myc et en augmentant celle de p21 et de p27. L'activité de ces deux protéines permet de diminuer l'activité des kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Coqueret 2003), qui elles-mêmes permettent la progression du cycle cellulaire en phosphorylant notamment la protéine du rétinoblastome (Rb). Lorsque cette dernière est hypophosphorylée, en réponse au TGF- $\beta$  par exemple, elle bloque la croissance cellulaire en liant E2F qui est un facteur de transcription essentiel pour la progression du cycle de division cellulaire (Ji et Studzinski 2004). De plus, l'expression de Rb est augmentée par la VD de manière VDRE dépendante en association avec des C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein), ce qui stimule l'hématopoïèse (Ji et Studzinski 2004) et la granulopoïèse (Gery *et al.* 2004). Pour clore cet aperçu des interactions entre la VD, c-myc et Rb, nous pouvons également ajouter que l'expression de c-myc active la transcription de Id2 dont la fonction est d'inhiber l'activité de Rb et de se lier à ce dernier lorsqu'il est hypophosphorylé (Lasorella *et al.* 2000).

## **1.5.5 Spécificité de la transcription dans la différenciation myéloïde**

### **1.5.5.1 Déterminants du promoteur**

Généralement, les promoteurs myéloïdes sont courts (<500pb) et ils ne possèdent pas de boîtes TATA ou d'élément d'initiation (INR). Plusieurs promoteurs myéloïdes possèdent un site de liaison pour des facteurs de la famille ETS (E26 Transforming Sequence), comme PU.1, en amont du site d'initiation de la transcription (Greaves et Gordon 2002). Ce facteur peut interagir avec la « TATA Binding Protein » tout comme d'autres facteurs impliqués dans la transcription myéloïde, notamment Sp1 (Specificity protein 1), Oct et les C/EBP. Il a été proposé que cette absence de boîte TATA soit responsable de la plus grande plasticité observée au niveau de l'emplacement du site d'initiation de la transcription (Tenen *et al.* 1997). Les promoteurs peuvent être arbitrairement divisés en trois régions; le promoteur proximal, le promoteur distal et les « enhancers ».

Figure 7 : Structure d'un promoteur eukaryote et enhanceosome de l'IFN- $\beta$



Adapté de (Carey 1998) et (Latchman 2004)

Le promoteur proximal permet l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription. La liaison de facteurs de transcription amène d'abord le recrutement des TAF (TATA-Associated Factors) (Naar *et al.* 2001). Ces facteurs interagissent subséquemment avec des sous-unité de l'ARN polymérase dans la région basale (core promoter) pour former et stabiliser le complexe de pré-initiation (Albright et Tjian 2000; Latchman 2004). Bien que traditionnellement considérée comme ubiquitaire, une spécificité tissulaire est apportée par l'expression des TAF qui ne sont exprimés que dans certains types cellulaires (Dikstein *et al.* 1996; Freiman *et al.* 2001; Verrijzer 2001). Qu'ils soient spécifiques ou ubiquitaires, les TAF permettent néanmoins d'établir le lien entre la machinerie transcriptionnelle de base et les activateurs situés à proximité.

Ces activateurs sont situés dans le promoteur distal qui est composé d'éléments inductibles et constitutifs. Parmi les deux premières classes de facteurs de transcription identifiés nous retrouvons les familles Sp (Dyan et Tjian 1983; Dyan et Tjian 1983) et

C/EBP (Myers *et al.* 1986). Depuis la caractérisation initiale de ces deux familles de facteurs de transcription, il a été démontré que plusieurs autres facteurs de transcription viennent se lier sur de tels promoteurs pour réguler finement l'expression génique (Levine et Tjian 2003).

Les éléments de contrôle du locus et « enhanceurs » peuvent quant à eux être situés à une grande distance du promoteur proximal (plusieurs kb). Ces éléments sont indépendants de leur orientation, de leur localisation en amont ou en aval et sont généralement regroupés pour former un complexe d'activation ou « Enhanceosome » (Latchman 2004). Les facteurs recrutés sur ces éléments vont contrôler l'accessibilité de la chromatine aux promoteurs proximal et distal via une activité histone acétyltransférase et de remodelage de la chromatine (Fry et Peterson 2001; Greaves et Gordon 2002). Nous parlons généralement « d'enhancer » pour décrire une région qui affecte un gène, et de région de contrôle du locus pour définir des éléments dont l'activité affecte plusieurs gènes. Le rôle de ces deux types de régions similaires consiste à favoriser l'accès aux éléments du promoteur, ce qui augmente les probabilités de formation d'un complexe stable d'initiation de la transcription sur l'ADN.

Les facteurs de transcriptions agissent en synergie lorsque l'affinité des liaisons franchit un seuil d'activation, ce qui permet la formation de l' « enhanceosome » et l'initiation de la transcription (Carey 1998). Les éléments situés en *cis* qui permettent la formation de l' enhanceosome sont généralement situés sur des fragments de 100pb proximal du site d'initiation de la transcription (Alvarez *et al.* 2003). La configuration de la chromatine peut initialement favoriser ces interactions en rapprochant deux sites distaux et cette configuration de la chromatine pourra elle-même être stabilisée par la suite par les facteurs *trans* occupant ces sites (Alvarez *et al.* 2003). Le rapprochement de deux sites peut également être favorisé par la présence de facteurs de transcription pliant l'ADN (Latchman 2004), appelés également facteurs de transcription architecturaux. Ce type de facteurs de transcription reconnaît une conformation particulière de l'ADN plutôt qu'une séquence nucléotidique précise (Alvarez *et al.* 2003).

L'activité des facteurs de transcription formant l'enhanceosome peut être modifiée par la séquence liée, qui elle-même peut modifier la conformation des facteurs de transcription (Alvarez *et al.* 2003). Dans le modèle dit allostérique, les bases liées par le domaine de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription peuvent imposer des contraintes conformationnelles au facteur de transcription et affecter son activité et ses capacités de liaison à d'autres protéines (Lefstin et Yamamoto 1998). Ce phénomène est bien décrit dans le cas du récepteur de l'estrogène dont 4 sites de liaison ont été comparés (Wood *et al.* 2001). La séquence des quatre sites varie ce qui cause un changement de l'activité de même qu'une modification de l'affinité de liaison à l'ADN du récepteur à l'estrogène en fonction du site occupé. La digestion à la protéase V8 ou à la protéinase K démontre également un patron de digestion différent, conséquence d'une conformation différente du récepteur à l'estrogène selon le site lié (Wood *et al.* 2001). Il est également intéressant de noter que le même groupe a démontré que les récepteurs de l'estrogène  $\alpha$  et  $\beta$  modifient de manière différente la conformation de l'ADN (Schultz *et al.* 2002). Dans ce cas, le site présent en *cis* influence la conformation du récepteur tandis que le sous-type de récepteur à l'estrogène présent modifie de manière différentielle la conformation du promoteur lié.

Une fois formé, l'enhanceosome présente deux surfaces distinctes ; la première permet la liaison à l'ADN tandis que l'autre surface permet l'association de co-activateurs et de la machinerie de transcription basale de transcription (Carey 1998), dont les membres du complexe TFIID (TATA binding protein (TBP) et TBP associated factors) (Latchman 2004), ce qui favorise la formation du complexe transcriptionnel stable ou l'activation de ce dernier.

En plus de favoriser le recrutement et l'activation du complexe transcriptionnel, l'enhanceosome et les enhancers vont modifier la conformation de la chromatine. La liaison d'un facteur de transcription peut agir directement sur un nucléosome adjacent ou recruter un co-activateur qui pourra alors déstabiliser les nucléosomes environnants, ceci ayant pour effet de décondenser la chromatine (Latchman 2004). Cette déstabilisation peut se produire par une activité histone acétyltransférase du co-activateur recruté. Un tel co-activateur ajoute un groupement acétyl sur une histone du nucléosome, réduisant sa

charge positive et donc diminuant son affinité pour l'ADN. Des protéines peuvent également agir de manière ATP dépendante comme c'est le cas du complexe SWI/SNF. Ces complexes ATP dépendants peuvent modifier l'association des histones composant le nucléosome, faire glisser le nucléosome sur l'ADN ou encore déloger un nucléosome de l'ADN pour activer la transcription (Latchman 2004). D'autres mécanismes favorisés par les facteurs de transcription ou des co-activateurs, tels la phosphorylation, la méthylation et l'ubiquitination, peuvent également modifier l'état de la chromatine, influençant ainsi l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (Latchman 2004). L'histone H3, en particulier, est composé d'un domaine principal et d'une queue de 36 aa qui possède 5 sites d'acétylation, 3 sites de méthylation et 1 site de phosphorylation offrant de multiples possibilités de régulation (Nowak et Corces 2004).

En plus des éléments en *cis* qui permettent de recruter les éléments nécessaires à l'initiation de la transcription, la localisation nucléaire des gènes offre un niveau supplémentaire de régulation transcriptionnelle. À l'intérieur du noyau les chromosomes sont organisés en microdomaines ou territoires chromosomiques (Cremer et Cremer 2001; Alvarez *et al.* 2003; Williams 2003). Les régions d'euchromatine sont principalement regroupés à la périphérie des microdomaines (Cremer et Cremer 2001) ce qui permet de regrouper les régions activement transcrites dans un environnement à l'intérieur duquel la concentration de facteurs de transcription et des éléments de la machinerie transcriptionnelle est plus élevée (Osborne *et al.* 2004). De grands fragments de chromosomes peuvent également sortir des domaines chromosomiques et se retrouver dans l'espace interchromosomique, comme c'est le cas pour le complexe majeur d'histocompatibilité (Volpi *et al.* 2000; Kosak et Groudine 2004). Ces protubérances permettent notamment l'interaction physique et la co-régulation interchromosomique des gènes tel que démontré pour l'IFN $\gamma$  et l'IL-4 (Spilianakis *et al.* 2005). Il apparaît finalement que cette disposition tridimensionnelle des chromosomes et de leurs microdomaines varie selon le type cellulaire (Bolzer *et al.* 2005) et selon le stade de différenciation cellulaire (Kuroda *et al.* 2004; Stadler *et al.* 2004).

### 1.5.5.2 Facteurs de transcription impliqués

Table 1 : Gènes myéloïdes et leurs facteurs transcriptionnels associés

Gène	Facteur
CD11b	PU.1, Sp1
CD14	C/EBPs, Sp1
CD18	PU.1, GABP, Sp1
P47phox	PU.1
p67phox	AP-1, PU.1, Sp1
gp91phox	PU.1, ICSBP, CDP, HoxA10
Lactoferrine (LF)	C/EBPs, Sp1, CDP
Macrosialine	PU.1, c-Jun
Scavenger receptor	PU.1, c-Jun

Adapté de (Friedman 2002), (Li *et al.* 2001)

#### 1.5.5.2.1 Sp1

Comme nous l'avons dit, Sp1 fut l'un des premiers facteurs de transcription identifiés. Bien que son expression soit ubiquitaire, la protéine Sp1 est, paradoxalement (à priori), déterminante pour la spécificité myéloïde de l'expression de plusieurs gènes, dont CD14 (Zhang *et al.* 1994), CD18 (Bush *et al.* 2003), la lactoferrine (Khanna-Gupta *et al.* 2000), p67<sup>phox</sup> (Li *et al.* 2001) et p27<sup>kip</sup> (Inoue *et al.* 1999). Les protéines associées à Sp1 peuvent expliquer en partie l'importance de ce facteur dans la transcription myéloïde. L'association avec des membres de la famille ETS, comme PU.1 dans le cas du gène *Btk* (Muller *et al.* 1999), ou avec des membres de la famille C/EBP, comme dans le cas du gène de la lactoferrine (Khanna-Gupta *et al.* 2000), peut expliquer en partie la spécificité myéloïde apportée par Sp1. Durant la différenciation myéloïde, il a été démontré *in vivo* que la liaison de Sp1 au promoteur de *CD11c* augmente, suggérant que le contrôle épigénétique de gènes myéloïdes permettrait de révéler les sites Sp1, d'où l'apparente spécificité myéloïde de ce facteur (Chen *et al.* 1993; Resendes et Rosmarin 2004).



La spécificité apportée par Sp1 est cependant beaucoup plus complexe. Le ratio de Sp1 et Sp3 est crucial pour l'activité des promoteurs et varie en fonction du type cellulaire et de l'état de différenciation. Cette importance est observée dans le cas du promoteur de CD14 pour lequel un SNP (single nucleotide polymorphism) fonctionnel modifie l'affinité pour Sp1 mais pas pour Sp3 (LeVan *et al.* 2001). Dans la lignée HL-60, la protéine Sp1 est retrouvée principalement sous une forme clivée et inactive de 30 kDa dans les cellules non-différenciées et sous sa forme non-clivée suite à la différenciation par la VD (Rao *et al.* 1998). D'autres modifications post-traductionnelles affectent l'activité de la protéine Sp1 comme la phosphorylation (Zhang *et al.* 1994; Rohlf *et al.* 1997), l'acétylation (Ryu *et al.* 2003) et l'O-glycosylation (Han et Kudlow 1997).

#### **1.5.5.2.2 C/EBP**

La famille des C/EBPs est composée de six membres; C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$ , C/EBP $\gamma$  et CHOP. L'expression des différents membres varie durant l'hématopoïèse (Friedman 2002). C/EBP $\alpha$  est exprimé principalement dans les granulocytes immatures (Scott *et al.* 1992) et joue un rôle clé dans la granulopoïèse (Radomska *et al.* 1998). C/EBP $\alpha$  semble jouer ce rôle d'induction de la différenciation en coopération avec p21<sup>waf</sup> (Harris *et al.* 2001) dont nous avons déjà décrit l'implication dans la régulation de l'arrêt de la prolifération cellulaire. Un autre membre, C/EBP $\epsilon$ , est exprimé plus fortement dans les granulocytes matures (Antonson *et al.* 1996). Les C/EBPs sont importants pour l'expression de fonctions associées à la différenciation terminale tant dans un contexte granulocytaire, par exemple pour le gène de la lactoferrine (Khanna-Gupta *et al.* 2000), que dans un contexte monocytaire pour CD14 (Pan *et al.* 1999). Il a par ailleurs été démontré que C/EBP $\beta$  est essentiel pour la différenciation de la lignée cellulaire HL-60 induite par la VD (Ji et Studzinski 2004). Bien que *in vitro* les membres de la famille peuvent lier les mêmes séquences, *in vivo* la spécificité est conférée par la nature des différents isoformes impliqués.

#### **1.5.5.2.3 PU.1**

La famille ETS est centrale pour l'expression myéloïde et le représentant ayant reçu le plus d'attention jusqu'à maintenant est PU.1. Le knock-out murin ne possède pas de

macrophages ni de lymphocytes B matures (Scott *et al.* 1994; McKercher *et al.* 1996). Le niveau d'expression de PU.1 est crucial pour l'action de ce facteur; une forte concentration est associée au développement de macrophages tandis qu'une plus faible concentration est associée au développement de lymphocytes B et de granulocytes (Dahl et Simon 2003). Le niveau d'expression de ce facteur peut également jouer un rôle dans le développement de leucémies myéloïdes aiguës (AML) (Rosenbauer *et al.* 2004). PU.1 interagit avec les co-activateurs IRF-4 (Interferon Response Factor-4) et IRF-8, également dénommé ICSBP (Interferon Consensus Sequence Binding Protein) (Marecki *et al.* 2001). Il est suggéré que PU.1, éventuellement avec le complexe ICSBP, permet de recruter le complexe transcriptionnel pour les promoteurs dépourvus de boîte TATA ou d'éléments initiateurs (INR) (Eklund et Kakar 1999). Lors de la différenciation de la lignée HL-60, l'activité de PU.1 est régulée notamment par une augmentation de son niveau de phosphorylation qui corrèle avec une augmentation de son affinité de liaison à l'ADN (Marden *et al.* 2003). Finalement, une action antagoniste mutuelle est observée avec le facteur GATA-1 qui dirige l'érythropoïèse (Rekhtman *et al.* 1999; Zhang *et al.* 1999).

#### **1.5.5.2.4 MEF**

Bien que l'action de PU.1 soit très importante, d'autres membres de la famille ETS peuvent remplacer ce facteur (Dahl *et al.* 2002). Un des membres de cette famille qui semble être important pour l'expression de gènes liés à l'immunité innée est MEF (Myeloid Elf-1 like Factor) (Lacorazza et Nimer 2003). MEF est spécifiquement exprimé dans des lignées cellulaires myéloïdes comme HL-60, K562 et U-937 (Miyazaki *et al.* 1996). L'activité de MEF varie durant la progression du cycle cellulaire et est maximale vers la fin de la phase G1 (Miyazaki *et al.* 2001). Bien que le knock-out semble indiquer que MEF n'est essentiel dans l'hématopoïèse que pour la production de cellules NK et NK-T (Lacorazza *et al.* 2002), le facteur est impliqué dans l'activité transcriptionnelle de gènes exprimés dans les cellules myéloïdes comme *IL-8* (Hedvat *et al.* 2004), *MMP-9* (Seki *et al.* 2002) et *CD68* (O'Reilly *et al.* 2004). Dans ce dernier exemple, toutefois, l'association n'est démontrée qu'*in vitro*.

Table 2 : Famille ETS

Sous-famille	Facteur
Ets	Ets-1 Ets-2
TCF	Elk-1 SAP-1 SAP-2/Net Lin-1
Erg	Fli-1 Erg
PEA3	PEA3 ERM ER81
GABP	GABP $\alpha$
Elf	Elf-1 NERF-1/-2 MEF
Spi	PU.1 SpiB SpiC
Yan	TEL TEL2 Yan
Erf	ERF PE-1

Adapté de (Lacorazza et Nimer 2003)

#### 1.5.5.2.5 CDP

La régulation eucaryote, à l'opposé de la régulation procaryote, est principalement tributaire de la liaison d'activateurs. Il existe cependant des facteurs de transcription qui peuvent agir comme répresseurs, comme la famille CDP (CCAAT Displacement Protein)

qui possède deux paralogues chez les vertébrés supérieurs, qui permettent d'inhiber l'activité transcriptionnelle de certains gènes. Dans un contexte myéloïde, une telle inhibition est observée par la CDP1 sur le promoteur de la gp91<sup>phox</sup> (Skalnik *et al.* 1991), celui de la lactoferrine (Khanna-Gupta *et al.* 1997) et celui de C/EBP $\epsilon$  (Khanna-Gupta *et al.* 2003). L'expression de la CDP1 diminue avec la différenciation myéloïde (Skalnik *et al.* 1991; Bjerregaard *et al.* 2003) de même que son association avec certains promoteurs (Khanna-Gupta *et al.* 2003). L'expression de gènes lors de la différenciation myéloïde terminale peut donc être tributaire de la diminution de l'expression ou de l'activité d'un répresseur.

### 1.5.5.3 *CD14* et *CD18* : deux gènes régulés dans les cellules myéloïdes

Le marqueur de différenciation CD18 constitue la chaîne  $\beta$  des intégrines des leucocytes. Elle s'associe avec CD11a, CD11b ou CD11c pour former respectivement le récepteur LFA-1 (lymphocyte function associated antigen-1), Mac-1 et p150/95. L'activité transcriptionnelle de *CD18* est régulée lors de la différenciation myéloïde et est induite notamment lors de la différenciation de la lignée HL-60 stimulée par l'ATRA, le DMF ou le PMA (Hickstein *et al.* 1988; Rosmarin *et al.* 1992). Le promoteur de *CD18* est régulé par deux régions ; une proximale de 96pb contenant deux sites de liaison Sp1 et trois sites de liaison pour des membres de la famille ETS ainsi qu'une distale située à 900pb en amont et qui possède un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) pouvant lier l'hétérodimère RAR-RXR (Bush *et al.* 2003). Malgré le fait que la première région ne lie pas directement le récepteur de l'acide rétinoïque, elle permet néanmoins l'activation du promoteur en réponse à l'ATRA. Cette activité est causée par la formation d'un enhanceosome pouvant lier le co-activateur CBP/p300, démontrant l'importance de l'activation par Sp1 et des membres de la famille ETS dans l'activation transcriptionnelle en réponse aux stimuli hormonaux (Bush *et al.* 2003).

CD14 est un récepteur membranaire exprimé à la membrane des monocytes/macrophages lors de la différenciation monocyttaire et qui est régulé au niveau transcriptionnel par la vitamine D (Zhang *et al.* 1994). Ce récepteur, qui participe à la reconnaissance du LPS de concert avec TLR4, est essentiel à la reconnaissance du LPS lisse (smooth) (Jiang *et al.*

2005). Un site de liaison pour Sp1 est essentiel à l'activation du promoteur par la VD (Zhang *et al.* 1994) et un autre site Sp1 chevauche un SNP qui a un impact sur la liaison de Sp1 à ce site et sur l'activité du promoteur *in vitro* (LeVan *et al.* 2001). MEF2D (myocyte enhancer binding factor 2) est un facteur de transcription de la famille des boîtes MADS dont l'expression augmente lors de la différenciation monocyttaire de la lignée HL-60 (Shin *et al.* 1999), qui possède un domaine de liaison à l'ADN, mais qui agit en tant que co-activateur liant Sp1 pour stimuler l'activité du promoteur de *CD14* (Park *et al.* 2002). Un site de liaison pour les membres de la famille C/EBP est également essentiel pour l'activation du promoteur en réponse à la différenciation induite par la VD seule ou en combinaison avec le TGF- $\beta$  (Pan *et al.* 1999) et la pRb agirait en tant que co-facteur de C/EBP $\beta$  permettant la réponse à la VD (Ji et Studzinski 2004).

### *Perspective sur les travaux effectués*

Bien qu'il y a plus de 40 ans que la lutte aux maladies infectieuses fut déclarée gagnée, ces dernières constituent un problème toujours bien réel. De plus, l'émergence de souches résistantes aux traitements actuellement utilisés et l'essoufflement du développement de nouvelles molécules actives nous poussent à envisager de nouvelles avenues thérapeutiques. Une de ces avenues est la caractérisation des gènes de susceptibilité aux infections afin de mieux connaître et pouvoir éventuellement moduler la réponse de l'hôte en réponse aux infections.

Des polymorphismes du gène *NRAMP1* humain, orthologue d'un gène candidat isolé chez la souris, sont aujourd'hui associés à la résistance chez l'homme aux infections mycobactériennes que sont la lèpre et la tuberculose. Le gène code pour une protéine membranaire intégrale exprimée dans les phagocytes matures. Cette protéine, partie intégrante de l'arsenal antimicrobien de l'hôte, permet l'exclusion des métaux divalents du phagosome contenant les pathogènes, privant ces derniers de co-facteurs essentiels à leur croissance et à leur défense contre le stress oxydatif.

La protéine NRAMP1 fait partie d'une famille de transporteurs de métaux hautement conservés dans l'évolution et un homologue associé à l'homéostasie du fer, *NRAMP2*, est présent chez les mammifères.

Il est possible que NRAMP1 ait conservé sa fonction de transporteur de métaux mais a acquis un rôle spécifique dans l'immunité innée via une expression restreinte aux cellules myéloïdes et une localisation intracellulaire orientée vers le phagosome. C'est donc dans ce contexte que nous avons entrepris l'étude de la régulation de l'expression du gène *NRAMP1* lors de la différenciation myéloïde terminale.

## Chapitre 2: Premier article

Regulation of *NRAMP1* gene expression by  $1\alpha$ , 25-dihydroxy-vitamin D3 in HL-60 phagocytes

### *Mise en contexte du premier article*

Suite au clonage du gène *Nramp1* (Vidal *et al.* 1993) responsable de la susceptibilité de certaines lignées murines aux infections, notamment face aux mycobactéries, et au début de la caractérisation de la protéine murine, des études furent entreprises afin d'isoler l'homologue humain (Cellier *et al.* 1994) et de caractériser son expression (Cellier *et al.* 1997). Il a ainsi été démontré que l'expression du gène *NRAMP1* était restreinte aux phagocytes professionnels et que cette expression menait à l'accumulation de l'ARNm de *NRAMP1* lors de la maturation *in vitro* des monocytes en macrophages. Les lignées cellulaires d'origine myéloïde HL-60, KG1, U937, THP1 expriment également l'ARNm de *NRAMP1* et ce de manière proportionnelle au stade de différenciation de leur immortalisation, offrant ainsi des modèles d'étude de la régulation de l'expression du gène humain. De plus, tout comme la maturation des monocytes, la différenciation de HL-60 en type monocyte/macrophage induite par la vitamine D permet l'augmentation de l'expression de *NRAMP1*. Sachant le rôle que peut jouer la VD dans la réponse à *M. tuberculosis* (Rook *et al.* 1986; Rook 1988) et puisque la VD permet l'activation des macrophages, nous avons entrepris de caractériser l'effet de la VD sur l'expression de *NRAMP1* dans la différenciation myéloïde de la lignée cellulaire HL-60.

Le projet a été initié dans le laboratoire par le Dr. Eva Roig, qui a étudié la régulation de l'expression de l'ARNm de *NRAMP1* au cours de la différenciation de HL-60 induite par la vitamine D et les deux analogues génomiques KH 1060 et EB 1089. Cette différenciation est caractérisée par l'apparition du marqueur de surface CD14 (Fig.1).

C'est dans ce contexte que j'ai débuté ma contribution au projet en effectuant l'analyse de l'ARNm de *NRAMP1* lors de la différenciation induite par l'analogue EB1089, sous la supervision du Dr Roig, durant un stage de recherche. Au début de mon programme

d'étude, toujours sous la supervision du Dr. Roig, je me suis attardé à l'effet de l'IFN $\gamma$  sur l'activation des cellules différenciées avec l'analogue EB1089 en suivant l'expression du marqueur de surface CD14 et de l'ARNm de *NRAMP1* (Fig.2A et Fig.2B). Nous (E.Richer et E.Roig) avons par la suite poursuivi la caractérisation de l'expression de l'ARNm de *NRAMP1* lors de doses réponses avec la VD, ses deux analogues génomiques de même qu'un agoniste (JN) et un antagoniste (HL) des effets non-génomiques de la VD afin de préciser le rôle du VDR dans l'activation transcriptionnelle du gène *NRAMP1* (Fig.3). J'ai également confirmé la validité du modèle en vérifiant l'expression de la protéine de même que sa relocalisation au phagosome suite à l'ingestion de *C. albicans*. Pour cette dernière étape, nous (E.Richer et E.Roig) avons bénéficié d'une collaboration avec le laboratoire du Dr Philippe Gros qui a produit l'anticorps anti-*NRAMP1* humain utilisé en immunofluorescence (Fig.4).

Durant la première partie de mon doctorat, j'ai débuté l'étude de la région active du promoteur lors de la différenciation myéloïde de notre modèle. J'ai ainsi pu identifier, dans un premier temps par transfection transitoire, puis à l'aide de transfectants stables, une région de 647 pb du promoteur du gène *NRAMP1* qui confère l'activation transcriptionnelle lors de la différenciation de la lignée HL-60 de même que la spécificité myéloïde de cette expression (Fig.5-7).



***Regulation of NRAMP1 gene expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> in HL-60 phagocytes***

**E. A. Roig<sup>\*</sup>, E. Richer<sup>\*</sup>, F. Canonne-Hergaux<sup>†</sup>, P. Gros<sup>†</sup> and M. F. M. Cellier<sup>\*</sup>**

<sup>\*</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, PQ, Canada; and

<sup>†</sup> Department of Biochemistry, McGill University, Montréal, PQ, Canada

Correspondence: M. F. M. Cellier, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Bd des prairies, Laval, H7V 1B7, PQ, Canada. E-mail: mathieu.cellier@inrs-iaf.quebec.ca

**ABSTRACT**

The natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) is a proton-dependent transporter of divalent metals. We studied NRAMP1 expression during HL-60 differentiation induced by VD and VD agonists. *NRAMP1* and *CD14* gene expression differed in kinetics of induction, mRNA levels and stability, and response to VD combined with PMA, whereas a combination of VD and IFN- $\gamma$  induced similar up-regulation. NRAMP1 protein expression paralleled the accumulation of mRNA and was localized in the phagosomal membrane after phagocytosis. A promoter construct extending 647 bp upstream of *NRAMP1* ATG showed myeloid-specific transcription in transient transfection assays, which was up-regulated by VD in HL-60. In HL-60 clones stably transfected with this construct, transcription was apparently induced through indirect VD genomic effects, and there was accordance between the levels of reporter transcription and endogenous *NRAMP1* mRNA in response to VD but not to IFN- $\gamma$ . Thus, VD genomic effects stimulate *NRAMP1* transcription and protein expression in maturing phagocytes.

**Key Words:** monocytic differentiation • interferon- $\gamma$  • Northern blot • immunofluorescence • luciferase reporter gene

## INTRODUCTION

The mouse natural resistance-associated macrophage protein (Nramp1) is expressed in the membrane of vacuoles from the late endosome-lysosome compartments of resting macrophages, together with the marker Lamp1<sup>1</sup>. Nramp1 is recruited to the phagosomal membrane after phagocytosis of a particle by mouse macrophages<sup>1</sup>. Nramp1 protein influences the maturation of the phagosome containing live mycobacteria<sup>2</sup> and contributes directly to control the intracellular replication of *Salmonella typhimurium*<sup>3</sup>. The antibacterial role of Nramp1 could be a result of the extrusion of protons and divalent metal ions such as Mn<sup>2+</sup> from the phagosome lumen toward the cytoplasm as a result of the combined electrochemical gradient of the proton, positive and acidic inside the phagosome as a result of V-type ATPases<sup>4</sup>. Restricting pathogen access to divalent metal ions such as Mn<sup>2+</sup> may impair their intracellular survival and replication<sup>5</sup>.

*Nramp1* was discovered in the laboratory mouse by positional cloning of the genetic factor responsible for innate susceptibility to several intravacuolar parasites such as *Mycobacterium* spp., *S. typhimurium*, and *Leishmania donovani*<sup>6</sup>. A recessive point mutation is responsible for inactivation of the encoded protein<sup>7</sup>. The human ortholog *NRAMP1* was located in a conserved group of synteny at 2q35<sup>8</sup>. *NRAMP1* and *Nramp1* genes are expressed specifically in the myeloid lineage (monocytes, macrophages, and polymorphonuclear neutrophils)<sup>9,10</sup>, contrasting with their paralogous genes *NRAMP2* and *Nramp2*, which are expressed almost ubiquitously and required for iron homeostasis<sup>1</sup>. In vitro maturation of human monocytes (Mn) into macrophages is accompanied by *NRAMP1* mRNA up-regulation, consistent with mRNA levels in explanted alveolar macrophages that are higher than those found in blood monocytes. The human leukemia cell line HL-60 was shown to be a useful model to study the regulation of *NRAMP1* gene expression during experimentally induced granulocytic and monocytic differentiation<sup>9</sup>.

*NRAMP1* gene expression is induced in HL-60 cells treated with the active form of vitamin D [ $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VD)], a seco-steroid hormone known to stimulate the production and terminal maturation of bactericidal macrophages. VD is viewed as a general regulator of cell growth, function, and differentiation, because virtually all cells can express the VD receptor (VDR), which acts as a transcriptional

regulator in the cell nucleus after binding VD. In vivo, the VD endocrine system is linked to calcium and phosphate metabolism<sup>12</sup>. VD is also recognized as a specific regulator of the differentiation and activation of the macrophage. VD influences myelopoiesis, favoring the development of the granulocyte-macrophage colony-forming precursor toward the mononuclear lineage<sup>13</sup> and further stimulating the differentiation of monocytes toward the macrophage and osteoclast cell types<sup>12,14</sup>, but not toward monocyte-derived dendritic cells<sup>15</sup>. VD also stimulates the phagocytosis and expression of natural defenses by macrophages<sup>16,17</sup>, which could suggest a basis for the positive effects on tuberculostasis shown for this hormone<sup>18</sup>.

Susceptibility to tuberculosis involves several predisposing genes inherited in a complex manner. Allelic polymorphisms in the *VDR* gene<sup>19</sup> and others at the *NRAMP1* locus<sup>20,21</sup> were associated with mycobacterial diseases. VD deficiency was also correlated with increased risk of tuberculosis<sup>22</sup>. In vitro studies indicate that VD pretreatment enhances MN control of the intracellular growth of mycobacteria, and VD action can be reinforced by a combination with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )<sup>23</sup>. VD, alone or in combination with IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$ , also induces the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and suppresses intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes<sup>24</sup>. Because VD is an important modulator of macrophage differentiation and activation that could be relevant to tuberculosis resistance, we undertook a study of the kinetics and possible mechanisms controlling NRAMP1 protein expression during VD-induced differentiation of HL-60 cells.

VD mediates its biological activities primarily at the level of gene transcription. The mechanisms of action of VD seem to operate via two independent receptors, the VDR, a member of the family of steroid hormone receptors<sup>25</sup>, and a cell surface receptor identified as annexin II<sup>26,27</sup>. The interaction of VD with a particular receptor is determined by the shape of the molecule of VD and conformationally restricted VD analogs enabled to discriminate between genomic (VDR-mediated) and (rapid) nongenomic effects of VD<sup>28</sup>. Nongenomic and genomic effects of VD appear required for monocytic differentiation<sup>29,30</sup>. Rapid (within minutes), nongenomic effects of VD include alterations of ion fluxes (e.g., Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>) and activation of protein kinase C (PKC)

and mitogen-activated protein kinases (MAPK) <sup>12,31</sup>. In this study, we used the 6-s-cis conformer of VD, 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-lumisterol<sub>3</sub> (JN), which is unable to bind to VDR, as an agonist of VD nongenomic effects, and the analog 1 $\beta$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (HL) as an antagonist of the VD nongenomic effects <sup>27,31,32</sup>. VD genomic effects are mediated by the VDR in homo or heterodimers with other steroids or retinoid receptors and additional transcriptional coregulators <sup>33</sup>. Several genes, including the cyclin-dependent kinase inhibitor p21waf1/cip1 and the homeobox transcription factor HOXA10, are targets for VDR-dependent up-regulation in myeloid cells at the onset of VD-induced differentiation <sup>34</sup>. In this study, we have used the analogs 20-*epi*-22-oxa-24a,26a,27a-tri-homo-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (KH 1060) and [1(S), 3(R)-dihydroxy-20(R)-(5'-ethyl-5'-hydroxy-hepta-1'(E),3'(E)-dien-1'-yl)-9,10-secopregna-5(Z),7(E),10(19)-triene] (EB 1089) as potent agonists of VD genomic effects.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell lines and culture**

The promyelocytic leukemia-derived HL-60 and the macrophage-like histiocytic lymphoma U-937 were originally obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) and were maintained in RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (HyClone, Logan, UT) or the substitute insulin-transferrin-selenium (Life Technologies) for serum-free conditions, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 25 mM HEPES, pH 7.4, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. For differentiation, cells were seeded at  $3 \times 10^5$  cells/mL ( $2 \times 10^5$  cells/mL for untreated cells). For cells induced to differentiate until day 5, an equal amount of culture medium supplemented with inducers was added on day 3. Final alcohol concentration did not exceed 0.1% in the cultures. Viability was assessed by the Trypan blue exclusion method. Differentiation efficiency was monitored using flow cytometry to follow surface expression of CD14 from day 0 through day 5. All experiments were repeated at least twice.

### **Differentiation agents**

9-cis-Retinoic acid (RA) and all-trans-RA (ATRA; TRC Chemicals, Toronto, Canada) were dissolved in ethanol at  $4 \times 10^{-3}$  M and  $2.5 \times 10^{-3}$  M as stock solutions. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  and analogs KH 1060 and EB 1089 were generously provided by Dr. Lise Binderup (Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Denmark). Stock solutions were in isopropanol at  $4 \times 10^{-3}$  M and were stored at -20°C protected from light. Analogues JN and HL were a kind gift of Dr. Anthony Norman from the University of California (Riverside). Stock solutions were in ethanol at  $1 \times 10^{-4}$  M and stored at -20°C protected from light. Actinomycin D obtained from Sigma Chemical Co. was dissolved in 10% ethanol. Recombinant human IFN- $\gamma$  was obtained from Endogen (Woburn, MA).

### **Flow cytometric analysis and monoclonal antibodies (mAb)**

Phenotypic analysis of cells was performed using mouse mAb detected by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated, affinity-purified donkey anti-mouse immunoglobulin G (IgG; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). The following mAb were used: 3C10 (IgG2b, anti-CD14) and OKM1 (IgG2b, anti-CD11b) from ATCC. Cultured cells ( $5 \times 10^5$ ) were harvested, centrifuged, and resuspended in blocking solution [phosphate-buffered saline (PBS)-0.1% bovine serum albumin (BSA) supplemented with 5% donkey or goat normal serum depending on secondary Ab used] for 15 min. A 30-min incubation on ice followed with primary antibody or isotype-matched control (Cedarlane, Canada). This was followed by three washing steps with PBS, and finally with a 30-min incubation with secondary antibody. After washing three times, cells were resuspended in PBS-5% BSA. Ten thousand cells were analyzed considering a viable cell gate as delimited by forward and right-angle light scatter parameters using an Epics flow cytometer (Coulter, Hialeah, FL).

### **Phagocytosis**

HL-60 cells were seeded in poly-D-lysine culture slides (Biocoat, BD-Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and were exposed to differentiation inducers for 3 or 5 days. Culture medium was replaced by fresh medium containing heat-inactivated *Candida albicans* (Ca) at a cell:Ca ratio of 1:100. Incubation was at 37°C for 1 h. Following extensive washing steps, preparations were incubated again for 1 h to enable complete phagocytosis. Slides were washed and processed for light microscopy or epi-immunofluorescence as described below.

### **Immunofluorescence**

Cells were allowed to differentiate on culture slides for phagocytosis experiments. Following 20 min fixation in Bouin's solution, cells were washed extensively, permeabilized for 10 min in 0.1% Triton-X 100 in PBS, washed again in PBS and PBS-100 mM glycine, and blocked for 1 h at room temperature in PBS-1% BSA-20% heat-inactivated donkey or goat serum depending on secondary antibody. Primary antibody

was incubated in blocking solution for 16 h at 4°C [rabbit polyclonal serum anti-NRAMP1 (see below, 1/50 dilution)] or for 1 h at room temperature (anti-c-Myc, 1/200 dilution, 9E10; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After washing with PBS-0.5% Tween 20, secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature (donkey R-phyco-erythrin-anti-rabbit, 1/200, Jackson ImmunoResearch; or goat FITC-anti-mouse, 1/400, Sigma Chemical Co.). After washing with PBS-0.5% Tween 20, culture slides were mounted with GelTol (Shandon, Pittsburgh, PA) and examined using a Leitz microscope with a 40x objective (400x magnification). Polyclonal- serum was generated against the N-terminus of human NRAMP1 protein, which was produced as a recombinant antigen fused to the glutathione-*S*-transferase as described previously<sup>34</sup>. The oligodeoxynucleotides 5HF 5'-TCG GAT CCT CAA TGA CAG GTG AC-3' and 5HR 5'-TAG AAT TCG CAG GCT GAA GGT G-3' were used to polymerase chain reaction (PCR)-amplify a fragment of 156 bp using 0.2 unit *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL, Burlington, Ontario), 1 µM each oligonucleotide, 25 µM dXTP, and 1.25 mM MgCl<sub>2</sub> in a 25 µL reaction of 1X reaction buffer supplied by the manufacturer. Plasmid C4<sup>8</sup> was used as template, and 25 cycles were performed (45 s at 94°C, 45 s at 42°C, 45 s at 72°C). The PCR fragment obtained was cloned after digestion with *Bam*HI and *Eco*RI into the vector pGEX-2<sup>35</sup> and was sequenced with primers 5HF and 5HR. One clone encoding the linker peptide GSS followed by NRAMP1 sequence MTGDK. ... . TFSLR was used to immunize rabbits. The NRAMP1 insert was excised from the pGEX-2 vector and was subcloned into the bacterial expression vector pQE40 (Qiagen, Mississauga, Ontario) to produce a His<sub>6</sub>-dihydrofolate reductase fusion chimera, which was used to affinity-purify the anti-NRAMP1 polyclonal serum as described previously<sup>11</sup>. The specificity of the purified antibody was established by Western blots of crude extracts and crude membrane preparations of transfected cells expressing a NRAMP1-c-Myc-tagged construct as described previously<sup>11</sup>.

### **RNA isolation and Northern hybridization**

Total RNA was isolated from 10<sup>7</sup> cells by the guanidine isothiocyanate method (Tri-reagent, Sigma Chemical Co.). Following electrophoresis in 1.2% agarose/formaldehyde gel, RNA was blotted onto GeneScreen + membranes (NEN Life Science Products,

Boston, MA) in 20x saline sodium citrate (SSC). After cross-linking with UV, blots were prehybridized overnight at 65°C in 1 M NaCl, 10% dextran sulfate, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 200 µg/mL heat-denatured herring sperm DNA. Hybridization probes for *NRAMP1* and *CD14* genes were as described<sup>9</sup> using 2 × 10<sup>6</sup> cpm/mL hybridization mix. The same blots were probed for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) to assess equal loading per well, using 5 × 10<sup>4</sup> cpm/mL hybridization mix. Hybridization was performed overnight at 65°C in prehybridization solution containing 2 × 10<sup>6</sup> cpm/mL denatured [<sup>32</sup>P]-dCTP-labeled random-primed DNA probe. Membranes were washed one time in 1x SSC, two times with 1x SSC-0.1% SDS-0.02% lauryl sarcosyl, then three times with 0.1x SSC-0.1% SDS-0.02% lauryl sarcosyl. Filters were then exposed to Kodak XAR X-ray films at -70°C with intensifying screens or to a phosphorimaging system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

#### **Construction of human NRAMP1 promoter-Luciferase reporter**

Restriction endonucleases were purchased from New England BioLabs (NEB; Mississauga, Ontario), except *SacI*, *BglIII*, *XbaI*, and *SmaI*, which were from Amersham Pharmacia Biotech (APB; Baie d'Urfé, Quebec). Enzymatic reactions were performed following the supplier's suggested conditions. A 290-bp fragment (base numbering starting at *NRAMP1* ATG) was PCR-amplified using as template the 5' promoter region of *NRAMP1* gene cloned in plasmid pKSB2-5<sup>8</sup> and the cloned *Pfu* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and primers ER1 5'-GGGAGGGGAACAAA GGTCCACT-3' (sense) and ER2 5'-CTGCCxATGGxAAATGCCGACTTCA-3' (antisense). The bases that were mutated to introduce an *NcoI* cleavage site surrounding the ATG are underlined. PCR conditions included five cycles (45 s at 94°C, 45 s at 55°C, 1 min at 72°C) followed by 25 cycles (45 s at 94°C, 45 s at 60°C, 1 min at 72°C). The PCR product of 290 bp was purified using a microspin S300 HR column (APB), digested with *NcoI* and ligated with the T4 DNA ligase (APB) to the pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI) treated with *NcoI* and the calf intestine phosphatase (APB). The orientation of the insert was determined by digestion with *EagI*. One clone corresponding to the promoter fragment in sense orientation showing a sequence identical to the parental DNA was denominated



pGL3 NR1S, and another corresponding to the antisense orientation was named pGL3 NR1AS.

A 645-bp promoter construct (pGL3 NR1L) was generated by ligation of three gel-purified fragments using the GeneClean II kit (Bio101, Vista, CA), including a 480-bp fragment produced by digestion of the plasmid pKSB2-5 with *EagI* and *BstY* and a 4276-bp *EagI*-*BsrGI* fragment derived from pGL3 NR1S and a 661-bp *BsrGI*-*BgII* fragment derived from the vector pGL3 basic. Two independent clones giving the expected pattern of restriction fragments after digestion with *EagI*, *PstI*, and *NcoI* were selected.

A shorter construct containing 584 bp of the promoter (pGL3 NR1M) was obtained by digestion of the plasmid pGL3 NR1L with the restriction endonucleases *PstI* and *SacI* and was treated with the T4 DNA polymerase (NEB) to produce blunt ends. The fragment of 5327 bp was gel-purified using the GeneClean II kit (Bio101) and self-ligated with T4 DNA ligase (APB). Two independent, resulting clones were verified with the restriction endonuclease *BamHI* and *XhoI*, giving the expected fragment of 5323 bp.

The construct pGL3 NR1dL containing a promoter region of 3629 bp was obtained using the 5350-bp *NheI*-*NsiI* DNA fragment derived from plasmid pGL3 NR1L and the 3032-bp *XbaI*-*NsiI* DNA fragment produced with the plasmid pB2-5. These restriction fragments were gel-purified using QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and were ligated with T4 DNA ligase (NEB). The resulting clone was verified with the restriction endonucleases *BamHI*, *BgII*, and *SmaI*, giving the expected fragment of 8382 bp and with *PstI*, *ScaI*, and *NcoI*.

### **Transient transfection assays**

Large-scale plasmid purifications of all the constructions were performed with the EndoFree MaxiPrep kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. The plasmids containing the luciferase reporter construction are described in the preceding section. The plasmid pXP2 with cytomegalovirus promoter driving the expression of the human growth hormone-coding sequence was a gift from Dr. D. G. Tenen (Harvard Institutes of Medicine, Boston, MA). Electroporations of the HL-60 cell line were

performed as described <sup>36</sup> with the following modifications: Day 2 (D2) differentiated cells ( $10^{-8}$  M VD and  $10^{-8}$  M KH or the equivalent volume of solvent alone) were diluted to a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL. On D3, cells were electroporated with 19  $\mu$ g reporter plasmid and 1  $\mu$ g control pXP2 human growth hormone (hGH) plasmid at 300 V and 975  $\mu$ F, incubated on ice for 15 min, and resuspended in 9 mL complete RPMI 1640. Cells were incubated at 37°C for 1 h before reincubating in the presence of inducer. Cells were incubated further at 37°C for 3 h before being harvested for luciferase extraction (Promega) and hGH quantification (Roche Diagnostics, Laval, Quebec). The tests were performed according to the manufacturer's protocols. Jurkat cells were electroporated in conditions similar to those for HL-60 cells. 293-T cells were transfected with cationic lipids according the manufacturer indications (GenePORTER, Gene Therapy Systems, San Diego, CA).

### **Generation and analysis of stable transfectants**

The promoter of the integrative expression vector Sr $\alpha$  puromycin was removed by partial restriction of the plasmid with *EcoRI* and *HindIII*, and the fragment of 4 kb was purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen). DNA overhangs were filled-in with the T4 DNA polymerase (NEB) in the presence of dXTP. Following ligation with the T4 DNA ligase (NEB), two independent clones verified by restriction with *HindIII*, *SmaI*, and *BamHI* were selected and named Sr $\alpha$ -. This vector was digested with restriction endonucleases *SmaI* and *BamHI*, treated with the calf intestinal phosphatase (NEB), and gel-purified. It was ligated to a 2770-bp DNA fragment, which was gel-purified after digestion of plasmid pGL3 NR1L with endonucleases *BamHI*, *NotI*, and *AseI*. This fragment was ligated in the digested vector Sr $\alpha$ - using the T4 DNA ligase (NEB). One clone (SrL) giving the expected length when digested with *BamHI* was sequenced using the primers ER2 and RVp3 (Promega). The plasmid SrL was produced with the EndoFree MaxiPrep kit (Qiagen). The day preceding the electroporation, the cells were washed and resuspended at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells/mL. Cells ( $1.4 \times 10^7$ ) were electroporated in the same conditions as for the transient transfection assays with 40  $\mu$ g undigested DNA, incubated on ice for 15 min, resuspended in 10 mL complete RPMI medium, and incubated at 37°C for 48 h. Viable cells ( $\sim 4 \times 10^6$ ) were seeded into 96-well trays at  $4 \times 10^4$

cells/well in a total volume of 200  $\mu\text{L}$ , and puromycin was added at a concentration of 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . After 2 weeks, half the medium was replaced with fresh medium containing puromycin. After 1–3 additional weeks, clones resistant to puromycin were detected in few wells (0.3%) and were amplified separately. Clones were tested by reading luciferase activity before and after differentiation with KH  $10^{-8}$  M for 3 days, which was monitored by analysis of CD14 expression by flow cytometry and Northern blot. For luciferase assays, cells ( $2 \times 10^5$ – $1 \times 10^6$ ) were washed once with PBS, resuspended in 100  $\mu\text{L}$  reporter lysis buffer (Promega), and then subjected to two freeze-and-thaw cycles. The lysate (20  $\mu\text{L}$ ) was used to quantify the luciferase as described in the transient transfection assays. Luciferase activity measured with a luminometer Lumat LB9507 (Berthold, Australia) was normalized with determination of total protein levels in each extract with the BCA-200 protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol. Seven clones were isolated out of five electroporations (frequency,  $1 \times 10^{-7}$ ). Of these, three were positive for luciferase expression and named clones HSRL1, HSRL4, and HSRL5.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Kinetics of *NRAMP1* gene expression during VD-induced differentiation

CD14, a pattern recognition surface receptor of phagocytes, represents a myeloid cell marker expressed specifically after VD-induced maturation toward macrophages. Induction of monocytic differentiation with VD can be divided in at least two stages with a transient phase of cell proliferation preceding cell-cycle arrest and terminal maturation. *CD14* gene expression is induced before the cell-cycle arrest that occurs between 24 and 48 h<sup>37,38</sup>. Up-regulation of CD14 expression reflects transcriptional activation of the gene<sup>39</sup> and has been quantified at the cell surface by flow cytometry to monitor cellular differentiation. HL-60 cells were induced to differentiate in cultures supplemented with 10 nM VD compounds. Kinetic experiments showed that CD14 surface expression was induced after 24 h of treatment (Fig. 1A, VD and No treatment), peaking around 48 h after VD-induced differentiation, and persisted at slightly decreased levels from day 3 to day 5. Parallel accumulation levels were observed for *CD14* mRNA by Northern analyses (Fig. 1B, left panel), consistent with the known transcriptional control of CD14 expression during differentiation.

The expression of the *NRAMP1* gene followed a distinct kinetic, showing a delay in the induction and the time necessary to reach maximum expression levels (Fig. 1B, left panel). *NRAMP1* mRNA accumulation was detected only after 2 days of treatment and persisted until day 5 of differentiation (Fig. 1B, left panel). These results confirmed previous studies, showing a similar pattern of accumulation of *NRAMP1* transcript after 6 days of differentiation<sup>8,9</sup>. Because the levels of *NRAMP1* mRNA were relatively low, we tested whether the use of VD genomic agonists, known to induce more potent HL-60 cell differentiation, would increase *NRAMP1* signal. HL-60 cells were treated with the agonists EB and KH, which are known to affect VDR dimerization<sup>40</sup> and transcriptional activity differentially<sup>41</sup>. VD genomic agonists stimulated *CD14* mRNA and protein expression to higher and more sustained levels than those obtained with the same concentration of VD (Fig. 1A and 1B). *NRAMP1* mRNA accumulation was also induced more efficiently by KH and EB, beginning at day 2 and increasing progressively until day

5 of differentiation. This indicated that compared with CD14, NRAMP1 expression is restricted to the later stages of macrophage differentiation, thus seeming more similar in kinetics and expression levels to other functional markers such as CD11b<sup>38</sup>. Similar results were obtained with HL-60 cells cultured in serum-free conditions (unpublished results). Assuming that *CD14* gene transcription is stimulated in the first hours after induction of differentiation with VD in HL-60 cells<sup>34</sup>, the results obtained for *NRAMP1* suggested the gene could be activated more tardily. For instance, *NRAMP1* promoter might not be accessible to VDR as a result of the chromatin conformation in undifferentiated cells; alternatively the *NRAMP1* gene may not be under the direct control of VDR, representing a secondary target that is activated later in the monocytic differentiation process induced with VD genomic analogs.

### **Cooperative effects of VD genomic agonists and IFN- $\gamma$ stimulate *NRAMP1* gene expression**

VD and IFN- $\gamma$  can exert additive effects on macrophage activation for bacteriostatic functions<sup>42</sup> and on monocytic differentiation of HL-60 cells<sup>43</sup>. Because IFN- $\gamma$  is a key immunoregulatory cytokine required for tuberculostasis<sup>23</sup> and up-regulates the autocrine production of VD by tissue macrophages<sup>44</sup>, we analyzed the effect of the combination of IFN- $\gamma$  and VD compounds on *NRAMP1* gene expression.

IFN- $\gamma$  alone is a poor inducer of HL-60 differentiation and CD14 cell-surface expression when compared with VD (Fig. 2A). However, the combination of IFN- $\gamma$  with VD genomic agonist EB strongly stimulated cell-surface expression of CD14 (Fig. 2A). Figure 2B shows strong up-regulation of *CD14* mRNA for the combination of EB and IFN- $\gamma$  and little accumulation after stimulation with IFN- $\gamma$  alone, thus indicating that CD14 cell-surface expression levels reflected mRNA accumulation levels. Determination of *NRAMP1* mRNA levels in the same conditions revealed a very similar pattern of up-regulation, with high levels for the combination of the VD genomic agonist EB and IFN- $\gamma$ , followed by the combination of VD compounds, then VD alone, and low *NRAMP1* levels for cells induced only with IFN- $\gamma$ . Hence, *NRAMP1* and *CD14* genes were similarly up-regulated in response to the combination of EB and IFN- $\gamma$ .

To further understand the regulation of *NRAMP1* gene expression, the half-life of the mRNA was determined by Northern blot and phosphorimaging (Fig. 2C, top). Because *NRAMP1* transcript levels were very low in the first days following induction of differentiation, cells that had been treated for 3 days with the genomic agonist KH were used for treatments with the RNA synthesis inhibitor actinomycin D. As a control, the  $t_{1/2}$  of *CD14* mRNA was measured and estimated at approximately 2 h (Fig. 2C, middle), in agreement with a previous determination in VD-treated THP-1 cells<sup>39</sup>. The housekeeping gene *GAPDH* exhibited a much longer  $t_{1/2}$  in the range of 6 h (Fig. 2C, bottom), whereas the  $t_{1/2}$  of *NRAMP1* mRNA was estimated at 4 h (Fig. 2C, top).

Together, the results indicate that *NRAMP1* and *CD14* mRNA have different kinetics and turnover of expression. The combination of VD genomic agonist and IFN- $\gamma$  had similar cooperative effects on *NRAMP1* and *CD14* gene expression, despite their different regulation. This could be a result of cross-talk between the corresponding signaling pathways acting at the level of gene transcription, because VD and IFN- $\gamma$  can trigger rapid responses to initiate monocytic differentiation. Up-regulation of *NRAMP1* gene expression was also observed after 3-day treatments using combinations of VD and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) or interleukin-6. The effect was dependent on the dose of cytokine used but remained modest in comparison with the combination of EB and IFN- $\gamma$ . Up-regulation of *NRAMP1* mRNA levels was even stronger in cells treated with VD, IFN- $\gamma$ , and GM-CSF (unpublished results), a combination shown previously to exert synergistic effects on HL-60 differentiation<sup>45</sup> and on activation for macrophage bacteriotoxic functions<sup>46, 47</sup>. Therefore, the strong up-regulation of the *NRAMP1* gene in response to the combination of VD genomic agonist and IFN- $\gamma$  probably reflects a cooperative effect of these compounds to induce macrophage differentiation and up-regulation of antibacterial functions.

### **Contribution of VD genomic and nongenomic effects to the induction of *NRAMP1* gene expression**

To gain further insight into the mechanism of action of VD on *NRAMP1* gene expression, various treatments were assayed combining the native hormone VD and conformationally restricted VD analogs or retinoids (RA, ATRA). Combinations with other independent

regulators of cellular transcriptional activity that stimulate macrophage maturation and activation, such as phorbol ester and IFN- $\gamma$ , were also assayed. The effects of selected combinations on the expression of *NRAMP1* and *CD14* genes were determined after 3 days by Northern analysis (Fig. 3A), phosphorimaging, and normalization of signal intensities to the level of *GAPDH* signal per sample (Fig. 3B). Combination treatments (20 nM VD compounds; e.g., 2VD, 20 nM VD; VD KH, 10 nM VD; and 10 nM KH) were performed to evaluate the relative influence of genomic versus rapid responses induced by VD on *NRAMP1* gene expression.

The VD genomic agonists KH and EB were each more effective than VD to induce *NRAMP1* and *CD14* mRNA accumulation, consistent with the results observed in time course experiments (Fig. 1). This suggests that stimulation of *NRAMP1* gene expression involves some VDR-mediated genomic effects of VD. Combinations of VD and KH or EB were as effective as the use of a single agonist or both agonists together (Fig. 3A and 3B). These similar effects further suggest that VDR may not act directly on the *NRAMP1* promoter but through the relay of other transcription factors involved later in the differentiation process.

Combinations of VD and retinoids such as the RA receptor (RAR) ligand, ATRA, and the RXR ligand, 9-*cis* RA, were also assayed because retinoids are known to potentialize HL-60 differentiation through the formation of VDR heterodimers<sup>48</sup>. Equimolar combinations with VD (Fig. 3A and 3B, lanes VD ATRA 10<sup>-8</sup> M, and VD 9-*cis* RA 10<sup>-8</sup> M) appeared similarly effective than VD alone to stimulate *CD14* and *NRAMP1* gene expression. Induction levels for both genes were inferior to those obtained with combinations of VD and genomic agonists (Fig. 3A and 3B, lanes KH VD and EB VD). 9-*cis* RA showed clear dose-dependent inhibition of *NRAMP1* and *CD14* expression (Fig. 3, lane VD 9-*cis* RA 10<sup>-9</sup> M), whereas ATRA inhibited minimally *NRAMP1* and *CD14* mRNA levels (Fig. 3, lane VD ATRA 10<sup>-9</sup> M and VD ATRA 10<sup>-7</sup> M). These results suggest that *NRAMP1* gene expression induced by VD can be modulated by cotreatment with 9-*cis* RA, further supporting a role for VDR in the stimulation by VD of *NRAMP1* gene expression. The relatively weak effects observed with combinations of VD genomic agonists and retinoids contrast with the known abilities of these compounds to stimulate cellular differentiation

strongly and could be a phenomenon of the HL-60 cell line <sup>48</sup>. These results support the view that the *NRAMP1* gene is probably not a direct target for VDR and suggest that VDR-dependent up-regulation of *NRAMP1* expression might be mediated via homodimers of this transcription factor <sup>40,49</sup>.

To examine a possible contribution of the non-VDR signaling pathway, the effects of combinations of VD and the analogs JN and HL were tested. Equimolar combinations of VD and the agonist of VD nongenomic effects JN (Fig. 3A and 3B, lane VD JN  $10^{-8}$  M) gave expression levels for *CD14* or *NRAMP1* mRNA that are similar to those obtained with VD (lane 2VD) and inferior to those obtained with VD and KH or EB (Fig. 3, lanes KH VD or EB VD). In addition, dose-dependent stimulation of VD effects was observed with JN compound on mRNA levels of *CD14* and *NRAMP1* (Fig. 3, compare lanes VD JN  $10^{-7}$  M and VD JN  $10^{-9}$  M). However, no stimulation was observed using JN as sole inducer (unpublished results). The combination of equimolar amounts of VD and the antagonist of nongenomic VD effects (HL) showed a strong inhibitory effect on the expression of *NRAMP1* and *CD14* genes induced by VD alone (Fig. 3A and 3B, lanes VD HL  $10^{-8}$  M and 2VD). This effect was not clearly dose-dependent in the conditions tested (Fig. 3A and 3B, lanes VD HL  $10^{-9}$  M and VD HL  $10^{-7}$  M). Together, the results suggest that in addition to VDR-dependent signaling, the rapid, nongenomic responses induced by VD could contribute to up-regulate the *NRAMP1* gene expression.

The JN agonist is thought to act in part through PKC stimulation <sup>50</sup>. Up-regulation of *NRAMP1* mRNA observed in response to JN (Fig. 3A and 3B) suggested that PKC could stimulate *NRAMP1* gene expression. The phorbol ester PMA is a pharmacological stimulator of PKC, whose isoform  $\beta$  (PKC- $\beta$ ) is required for macrophage differentiation of HL-60 cells <sup>51</sup>, and a combination of VD and PMA increases macrophagic differentiation of HL-60 cells and iNOS-dependent production of NO <sup>52</sup>. In addition, previous studies showed that PMA induced accumulation of *NRAMP1* mRNA in HL-60 cells, albeit less efficiently than VD <sup>9</sup>. Cotreatment of HL-60 cells with VD and PMA potentialized *NRAMP1* gene expression, particularly in combination with low concentrations of PMA (Fig. 3A and 3B, lanes VD PMA 1–100 ng/mL). In contrast, *CD14* gene expression was relatively inhibited. The latter result is consistent with the



absence of *CD14* mRNA accumulation in PMA-treated HL-60 cells<sup>9</sup>. Together, the results suggest that the VDR-dependent regulation of *NRAMP1* mRNA may be modulated via PKC signaling, possibly involving nongenomic effects of VD.

The most potent differentiation treatment tested so far included KH, IFN- $\gamma$ , and GM-CSF. It was about fivefold more efficient at inducing *NRAMP1* gene expression than the equimolar combination of JN, IFN- $\gamma$ , and GM-CSF (unpublished results). Thus VDR-mediated genomic effects of VD would be predominant in stimulating *NRAMP1* expression, and nongenomic signals induced by VD could also contribute to this process. In addition, potent transcriptional activators that are important for macrophage differentiation and that signal through independent pathways exerted cooperative effects with VD to up-regulate *NRAMP1* gene expression. Together, the data indicate a link between macrophage differentiation, up-regulation of antibacterial functions, and *NRAMP1* gene expression.

#### **IFN- $\gamma$ and PMA cooperate with KH to induce NRAMP1 protein expression in HL-60 cells**

*NRAMP1* gene expression induced by VD seemed to correlate with terminal differentiation, and combinations of VD with PMA or IFN- $\gamma$ , which potentialize the induction of phagocytic and bactericidal functions in HL-60 cells<sup>43,52</sup>, induced the highest levels of *NRAMP1* accumulation (Fig. 3). Therefore, we hypothesized that HL-60 cells differentiated with combinations of the VD genomic agonist KH and PMA or IFN- $\gamma$  should express NRAMP1 protein at detectable levels. A polyclonal antibody specific for NRAMP1 was generated. The purified polyclonal serum recognized NRAMP1 specifically in crude membrane preparations of stable U-937 transfectants (Fig. 4K). The minor bands observed could be a result of differences in glycosylation of the protein or could indicate limited proteolysis during membrane preparations. This specific antibody was used to study the protein expression by indirect immunofluorescence. This technique enabled previous detection of the endogenous membrane protein in the mouse<sup>53</sup> and suggested by analogy that NRAMP1 may be concentrated in intracellular vesicles of phagocytes. Therefore, an in situ immunofluorescence technique was chosen to favor detection in case the protein may be expressed at relatively low levels in HL-60 cells.

NRAMP1 protein expression was examined using cells differentiated for 5 days with a combination of 10 nM KH and 100 U/mL IFN- $\gamma$  (Fig. 4A 4B 4C 4D 4E 4F and 4J) or 10 nM KH and 10 nM PMA (Fig. 4G 4H 4I) . As expected from Northern studies (Figs. 2 and 3) , NRAMP1 protein was expressed at high levels in HL-60 cells differentiated with KH and IFN- $\gamma$  (Fig. 4A and 4J) and KH and PMA (Fig. 4H and 4I) . Detection of NRAMP1 protein required cell permeabilization and revealed an intracellular punctate pattern in resting cells (Fig. 4A) , which appeared similar to the intracellular distribution shown previously for Nramp1 in mouse macrophages <sup>1</sup> . Nonpermeabilized cells (Fig. 4B) and permeabilized cells analyzed with the preimmune serum (Fig. 4C) did not show comparable signal (Fig. 4A 4B 4C) . HL-60 cells differentiated with KH and IFN- $\gamma$  were also analyzed with an anti-CD14 antibody, used as a control for cell-surface protein expression independent of cell permeabilization (Fig. 4D 4E 4F) . Cell-surface fluorescence specific to CD14 was observed with cells that had been permeabilized (Fig. 4D) or not (Fig. 4E) but was not observed when omitting anti-CD14 antibody (Fig. 4F) . Thus, high levels of NRAMP1 protein expression are correlated with the highest levels of *NRAMP1* mRNA (Figs. 2 and 3) , suggesting that NRAMP1 expression may be controlled primarily at the level of transcription and mRNA stabilization.

Redistribution of NRAMP1 protein localization was observed after phagocytosis of heat-killed *C. albicans* by HL-60 cells differentiated with KH and PMA (Fig. 4G 4H 4I) . Figure 4I shows NRAMP1-specific intracellular fluorescence in resting cells that had not been challenged with any particles. Phase-contrast and fluorescence visualizations of the same field are shown in Figure 4G and 4H , respectively. Extracellular and intracellular *Candida* are identified in Figure 4G by the small and large arrows, respectively. The fluorescent image of the same intracellular particle, marked in Figure 4H by a replicate large, white arrow, shows decoration of the membrane surrounding the particle with anti-NRAMP antibody (Fig. 4H) . Similar images were visualized with phagocytic HL-60 cells differentiated with KH and IFN- $\gamma$  (Fig. 4J) . The pattern observed was apparently similar in resting cells (Fig. 4I) and in cells that did not ingest particles (Fig. 4H) , suggesting that phagocytosis itself triggered the subcellular redistribution of NRAMP1 protein toward the phagosomal membrane. Additional in situ analyses of protein expression in freshly explanted cells showed relatively little NRAMP1 protein in adherent MN, whereas most

of MN-derived Mac were positive for NRAMP1 protein expression, including in the presence of VD (unpublished results). Therefore, NRAMP1 protein expression seems to parallel mRNA levels detected in MN and MN-derived Mac<sup>9</sup>, suggesting that the expression of the antimicrobial NRAMP1 protein is a result of transcriptional up-regulation in terminally differentiated phagocytes<sup>54</sup>. These results suggest a physiological significance for VD-dependent NRAMP1 expression in HL-60 cells, thus emphasizing the usefulness of this model for the study of the regulation of *NRAMP1* gene expression.

### **The 5'-proximal region of the *NRAMP1* gene is VD-responsive and contains myeloid-specific elements**

*NRAMP1* promoter activity was quantified by luciferase reporter assays using five constructs representing different lengths of the *NRAMP1* 5'-untranslated region. Luciferase activity was analyzed 4 h after electroporation of differentiated HL-60 cells, which had been treated for 3 days with a combination of VD and KH and reincubated with the inducers after transfection. A 263-bp *NcoI* fragment containing the *NRAMP1* ATG mutated to an *NcoI* site was inserted in both orientations (S, sense; AS, antisense) in 5' upstream of the luciferase open-reading frame (ORF) from pGL3 basic plasmid. As expected, only the S construct gave significant reporter activity in nondifferentiated HL-60 cells [ $\sim 175$  relative luciferase units (RLU/s); Fig. 5A ], suggesting that basic elements for transcription initiation were present in this short fragment. Luciferase activity driven by the S construct was not up-regulated in VD-differentiated HL-60 cells (Fig. 5A) . Three other constructs extending 588 bp, 647 bp, and 3633 bp upstream of the ATG, respectively, M, L, and dL, were also active in HL-60. Constructs M and L exhibited similar luciferase activity ( $\sim 500$  RLU/s; Fig. 5A ;  $P < 0.05$ ), representing approximately threefold the level measured for construct S, and which was further stimulated twofold after treatment with VD and KH ( $\sim 1100$  RLU/s; Fig. 5A ;  $P < 0.05$ ). This suggests that the 5' region of the *NRAMP1* gene extending 588 bp upstream of the ATG contained cis elements conferring high-level expression in untreated HL-60 cells, as well as VD responsiveness in these cells. Finally, construct dL exhibited relatively lower activity in untreated HL-60 cells, suggesting that negative elements may be located further upstream of the proximal promoter ( $\sim 600$  bp). VD responsiveness could still be detected with the

dL construct (Fig. 5A) , but the low levels of expression dampen the analysis. These results demonstrate that transcriptional up-regulation can contribute to NRAMP1 protein expression during VD-induced differentiation and further suggest that *cis*-active elements conferring VD responsiveness in HL-60 may be localized between 588 and 262 bp upstream of *NRAMP1* ATG.

To gain further understanding in the regulation of *NRAMP1* gene expression, the same constructs were used to transfect nonmyeloid cell types. Reporter activity was measured in the embryonal kidney cell line 293, which can be transfected with high efficiency. The results showed that the AS construct exhibited negligible activity when compared with the other constructs (Fig. 5C) . However, the shortest sense construct, S, appeared the most efficient at driving luciferase expression in 293 cells (~350 RLU/s; Fig. 5C ), whereas constructs M and L were also very efficient (~300 RLU/s; Fig. 5C ), and construct dL showed slightly lower levels of reporter activity (~300 RLU/s; Fig. 5C ). A similar picture emerged from transfection studies in the lymphoid cell line Jurkat (Fig. 5B) . The AS construct again showed negligible activity, whereas the sense constructs S and L gave similar levels of reporter activity (~400 RLU/s). Maximum and minimum levels of reporter activity were observed with constructs M and dL, respectively (~550 RLU/s and ~125 RLU/s). Lymphocytes constitute a target tissue for some immunosuppressive activities of VD that are mediated by the VDR<sup>55</sup>. Therefore, we tested in conditions similar to the studies with HL-60 cells whether the *NRAMP1* promoter showed similar VD responsiveness in Jurkat T cells. Importantly, we found that none of the constructs tested were responsive to VD induction in Jurkat cells.

Together, these results demonstrate that the segment of 263 bp upstream *NRAMP1* ATG contains minimal elements required for basal transcriptional activity, which is not restricted to myeloid cells. In contrast, possible myeloid-specific determinants are contained in the region spanning from 588 and 262 bp upstream of the ATG of the *NRAMP1* gene. This region also contains elements that are required to mediate myeloid-specific VD responsiveness.

### **Transcriptional activation of *NRAMP1* 647-bp promoter is induced through VD genomic effects in stable transfectants**

Sequence analyses of the 647-bp promoter region using the software MatInspector V2.2<sup>56</sup>, the database Transfact, and the software SignalScan<sup>57</sup> with the Transfact<sup>58</sup> and Transcription Factor databases<sup>59</sup> failed to detect any VD response element. The region was also inspected visually for any motif of sequence A/G G G/T T N N (3 or 6) A/G G G/T T N N, which represents the consensus VDR-binding site<sup>60,61</sup>. Therefore, it appeared more likely that *NRAMP1* promoter activity did not result from direct binding of VDR but rather from stimulation by other transcription factors that may be activated later in the monocytic differentiation program. As a first step to study the soluble factors responsible for the activation of the *NRAMP1* promoter, stable transfectants were established in HL-60 cells to verify the transcriptional activity of the 647-bp construct in a chromosomal context.

The level of luciferase activity obtained after 3 days of differentiation induced with VD, KH, and EB was quantified in three independent clones (Fig. 6A). Induction ratios in the range of 1.5–2.5 were obtained with VD and in the range of 2.5–4.5, with VD genomic analogs EB and KH. Kinetic studies of luciferase expression in clone HSRL5 confirmed the delayed expression of the *NRAMP1* gene (Fig. 6B). Luciferase expression was induced significantly by VD and the genomic agonist EB at day 2 of differentiation, reaching a peak of expression at day 3. These data are consistent with the levels and kinetics of expression that were measured with the same inducers by Northern blot analysis (Fig. 1), confirming that the region starting 647 bp upstream of the ATG is sufficient to drive VD-dependent expression of *NRAMP1*.

We also followed luciferase expression in response to IFN- $\gamma$  because Northern analyses revealed that IFN- $\gamma$  is a weak inducer of *NRAMP1* expression, which stimulates EB- and VD-dependent expression strongly (Figs. 2 and 3, respectively). However, we could not detect IFN- $\gamma$ -dependent stimulation of the *NRAMP1*-luciferase construct in transient transfection assays using VD-differentiated cells (unpublished results). Here, strong expression of the *NRAMP1* construct was induced by IFN- $\gamma$  alone, and merely additive effects were obtained by a combination of IFN- $\gamma$  with VD or EB to stimulate luciferase

expression (Fig. 6B). These results were unexpected from our previous Northern analyses (Fig. 2) and indicated that unlike the regulation by VD genomic agonists, there is a clear difference in the response to IFN- $\gamma$  between the transcriptional activity of the *NRAMP1* 647-bp promoter construct and the regulation of *NRAMP1* mRNA levels.

The clone HSRL5 was also used to verify that the transcriptional activity of the *NRAMP1* 647-bp construct in response to induction with the VD genomic agonists was dose-dependent (Fig. 6C). KH analog was used to show it is between ten- and 100-fold more potent than VD to induce *NRAMP1* transcription, which is consistent with the relative potency for induction of monocytic differentiation shown for this analog<sup>62</sup>. In contrast, the nongenomic agonist of VD, JN, showed no noticeable effect on the promoter region conferring VD responsiveness during monocytic differentiation. This result further suggests that the *NRAMP1* 647-bp promoter is the key determinant for the gene and protein expression in monocyte/macrophage in response to VD genomic effects. Because *NRAMP1* mRNA accumulation and gene transcription are not significant before 48 h of differentiation and because no VDRE was found in the 647-bp region, it is logical to propose that transcription factors distinct from VDR, presumably involved in myeloid-specific expression, are the primary transacting factors for *NRAMP1* gene expression.

The response of the *NRAMP1* 647-bp construct to IFN- $\gamma$  was also dose-dependent, and combination with the VD-genomic agonist KH had only additive effects on luciferase activity (Fig. 6C), as observed in combinations of IFN- $\gamma$  with VD and EB (Fig. 6B). To demonstrate that the stimulation of the *NRAMP1* promoter construct by IFN- $\gamma$  did not reflect the endogenous regulation accurately, we compared *NRAMP1* mRNA levels and *NRAMP1*-dependent luciferase activity in the clone HSRL5. *NRAMP1* and *CD14* mRNA were stimulated very weakly in response to IFN- $\gamma$  compared with KH, and IFN- $\gamma$  had a potentializing effect on the accumulation of these mRNA induced by KH (Fig. 7A and 7C). These results are consistent with our previous analyses in HL-60 cells (Figs. 2 and 3), but this picture is clearly different from the results of luciferase activity obtained with clone HSRL5 (Fig. 7B), which shows the abnormally elevated response of the *NRAMP1* promoter construct to IFN- $\gamma$ . These results suggest that the transcriptional response to

IFN- $\gamma$  requires for proper regulation additional cis elements that are not present in the 647-bp promoter fragment of the *NRAMP1* gene.

## CONCLUSIONS

Previously, we had shown that high-level expression of the *NRAMP1* gene is restricted in vivo to mature myeloid cells: PMN and tissue macrophages<sup>8,9</sup>. Herein, using CD14 as an early marker of differentiation induced by VD, we demonstrate that *NRAMP1* mRNA and protein expression occur late during monocytic differentiation of HL-60 cells. Despite different kinetics of induction and turnover, the expression of *NRAMP1* and *CD14* mRNA was increased similarly using different genomic agonists that are more potent than VD, indicating that up-regulation of the expression of both genes involves VDR. A combination of VD or a genomic agonist with IFN- $\gamma$ , by itself a poor inducer of *NRAMP1* and *CD14* genes, strongly stimulated their expression at the mRNA and protein levels. Immunofluorescence analyses of NRAMP1 protein expression in HL-60 cells differentiated with VD and IFN- $\gamma$  showed a pattern typical of intracellular vesicles in resting cells. After phagocytosis, NRAMP1 protein was redistributed at the phagosomal membrane, where it is believed to mediate its antimicrobial function. Similar relocalization of NRAMP1 protein expression after phagocytosis was also observed after differentiation with VD and phorbol ester, a treatment that does not induce CD14 expression. Thus, HL-60 represents a valuable model to study the regulation of expression of NRAMP1 during the myelomonocytic differentiation induced by VD and more potent pharmacological VDR ligands. VDR ligands are known as potent immunomodulators that act directly on monocytes and their progeny (macrophages, dendritic cells) and on T-lymphocyte populations and that exert a dual role on the immune system. On one hand, their action on myeloid dendritic cells and T lymphocytes inhibits specific immune responses<sup>63, 64</sup>, and on the other hand, their action on promyelocytes, monocytes, and macrophages stimulates innate, nonspecific immunity by the up-regulation of microbicidal functions such as iNOS<sup>65</sup> and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase<sup>56, 66</sup>. It is interesting that the differentiation of monocytes toward dendritic cells is accompanied by down-regulation of NRAMP1 expression<sup>67</sup> and is inhibited in the presence of VD<sup>64, 68</sup>. In this context, it is tempting to suggest that up-regulation of NRAMP1 expression at the level of the phagosome by VDR ligands in monocytes could contribute to enhance innate immunity. Thus, it will be important to



characterize the molecular control of *NRAMP1* gene expression by VDR ligands. The HL-60 model presented here will be valuable because we demonstrated that a DNA fragment extending 647 bp upstream of *NRAMP1* ATG was sufficient to mediate transcriptional activation in response to VDR ligands in a dose- and time-dependent manner consistent with the induction of HL-60 differentiation. Of note, assays of *NRAMP1* promoter activity in epithelial and lymphoid cell types gave patterns of transcriptional activation, which were similar between these two unrelated, nonmyeloid cellular backgrounds but clearly distinct from the activity observed in HL-60. This could suggest that *NRAMP1* promoter activity in HL-60 cells is representative of myeloid cells, and further work will be required to demonstrate that this promoter operates in other myeloid cell lines. Contrarily to the regulation by VDR ligands, there was a clear discrepancy between *NRAMP1* gene transcriptional activity and mRNA accumulation in response to IFN- $\gamma$ . Thus, it is likely that additional cis elements outside the 647-bp DNA fragment contribute to regulate the expression of the *NRAMP1* gene. Among the putative binding sites for transcription factors that may be important for VDR-dependent regulation is a motif located in the region spanning from -588 to -262 bp upstream of the ATG, which appears conserved with mouse and chicken promoter *Nramp1* sequences <sup>9</sup>. This site could bind the transcription factor PU.1 that is required for tissue-specific expression of various effector functions of professional phagocytes <sup>9, 69</sup>. Further studies are required to identify cis-acting elements contained in the basic promoter of the *NRAMP1* gene and those involved in the transcriptional up-regulation of the *NRAMP1* gene in response to VD in myeloid cells and to localize additional IFN- $\gamma$ -responsive regions. These studies will reveal some molecular determinants controlling the expression of a divalent metal ion transporter that is expressed in mature phagocytes and important for host resistance to infection.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (M. F. M. C.; 203297-98) and the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec (M. F. M. C.; 970122-103). E. A. R. and E. R. are equally contributing authors. We wish to thank L. Binderup, M.D. (Leo Pharmaceuticals Products, Dk), for generously providing samples of VD and VD genomic agonists KH and EB and Pr. A. W. Norman (University of California, Riverside) for kindly providing the VD nongenomic analogs JN and HL. We also thank D. G. Tenen, M.D. (Harvard Institutes of Medicine), for support and kindly providing pXP2-derived plasmid. E. A. R. is the recipient of a J-L. Lévesque/Biochem-Pharma fellowship from the Fondation Armand-Frappier, and E. R. is supported by the FRSQ.

## REFERENCES

- 1) Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., Gros, P. (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome *J. Exp. Med.* **185**,717-730
- 2) Hackam, D. J., Rotstein, O. D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P., Grinstein, S. (1998) Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification *J. Exp. Med.* **188**,351-364
- 3) Govoni, G., Canonne-Hergaux, F., Pfeifer, C. G., Marcus, S. L., Mills, S. D., Hackam, D. J., Grinstein, S., Malo, D., Finlay, B. B., Gros, P. (1999) Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7 *Infect. Immun.* **67**,2225-2232
- 4) Jabado, N., Jankowski, A., Dougaparsad, S., Picard, V., Grinstein, S., Gros, P. (2000) Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane *J. Exp. Med.* **192**,1237-1248
- 5) Forbes, J. R., Gros, P. (2001) Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions *Trends Microbiol.* **9**,397-403
- 6) Vidal, S. M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., Gros, P. (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg *Cell* **73**,469-485
- 7) Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., Gros, P. (1995) The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene *J. Exp. Med.* **182**,655-666
- 8) Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., Sanchez, F., Skamene, E., Schurr, E., Gros, P. (1994) Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression *J. Exp. Med.* **180**,1741-1752
- 9) Cellier, M., Shustik, C., Dalton, W., Rich, E., Hu, J., Malo, D., Schurr, E., Gros, P. (1997) Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia *J. Leukoc. Biol.* **61**,96-105

- 10) Govoni, G., Gauthier, S., Billia, F., Iscove, N. N., Gros, P. (1997) Cell-specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo *J. Leukoc. Biol.* **62**,277-286
- 11) Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., Gros, P. (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron *Blood* **93**,4406-4417
- 12) Brown, A. J., Dusso, A., Slatopolsky, E. (1999) Vitamin D *Am. J. Physiol.* **277**,F157-F175
- 13) Nakamura, K., Takahashi, T., Sasaki, Y., Tsuyuoka, R., Okuno, Y., Kurino, M., Ohmori, K., Iho, S., Nakao, K. (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 differentiates normal neutrophilic promyelocytes to monocytes/macrophages in vitro *Blood* **87**,2693-2701
- 14) Ross, F. P. (2000) RANKing the importance of measles virus in Paget's disease *J. Clin. Investig.* **105**,555-558
- 15) Penna, G., Adorini, L. (2000) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation *J. Immunol.* **164**,2405-2411
- 16) Casteels, K., Bouillon, R., Waer, M., Mathieu, C. (1995) Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4**,313-318
- 17) Tokuda, N., Levy, R. B. (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**,244-250
- 18) Rook, G. A., Stanford, J. L. (1996) The Koch phenomenon and the immunopathology of tuberculosis *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **215**,239-262
- 19) Roy, S., Frodsham, A., Saha, B., Hazra, S. K., Mascie-Taylor, C. G., Hill, A. V. (1999) Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type *J. Infect. Dis.* **179**,187-191
- 20) Greenwood, C. M., Fujiwara, T. M., Boothroyd, L. J., Miller, M. A., Frappier, D., Fanning, E. A., Schurr, E., Morgan, K. (2000) Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family *Am. J. Hum. Genet.* **67**,405-416

- 21) Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K. P., Whittle, H. C., Hill, A. V. (1998) Variations in the NRAMPI gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans *N. Engl. J. Med.* **338**,640-644
- 22) Wilkinson, R. J., Llewelyn, M., Toossi, Z., Patel, P., Pasvol, G., Lalvani, A., Wright, D., Latif, M., Davidson, R. N. (2000) Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study *Lancet* **355**,618-621
- 23) Flynn, J. L., Chan, J. (2001) Immunology of tuberculosis *Annu. Rev. Immunol.* **19**,93-129
- 24) Rockett, K. A., Brookes, R., Udalova, I., Vidal, V., Hill, A. V., Kwiatkowski, D. (1998) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line *Infect. Immun.* **66**,5314-5321
- 25) Freedman, L. P. (1999) Transcriptional targets of the vitamin D<sub>3</sub> receptor-mediating cell cycle arrest and differentiation *J. Nutr.* **129**,581S-586S
- 26) Baran, D. T., Quail, J. M., Ray, R., Honeyman, T. (2000) Binding of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) to annexin II: effect of vitamin D metabolites and calcium *J. Cell. Biochem.* **80**,259-265
- 27) Baran, D. T., Quail, J. M., Ray, R., Leszyk, J., Honeyman, T. (2000) Annexin II is the membrane receptor that mediates the rapid actions of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) *J. Cell. Biochem.* **78**,34-46
- 28) Norman, A. W., Henry, H. L., Bishop, J. E., Song, X. D., Bula, C., Okamura, W. H. (2001) Different shapes of the steroid hormone 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D(3) act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses *Steroids* **66**,147-158
- 29) Wang, X., Rao, J., Studzinski, G. P. (2000) Inhibition of p38 MAP kinase activity up-regulates multiple MAP kinase pathways and potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced differentiation of human leukemia HL60 cells *Exp. Cell Res.* **258**,425-437
- 30) Marcinkowska, E. (2001) Evidence that activation of MEK1,2/erk1,2 signal transduction pathway is necessary for calcitriol-induced differentiation of HL-60 cells *Anticancer Res.* **21**,499-504

- 31) Norman, A. W., Song, X., Zanello, L., Bula, C., Okamura, W. H. (1999) Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> *Steroids* **64**,120-128
- 32) Norman, A. W., Manchand, P. S., Uskokovic, M. R., Okamura, W. H., Takeuchi, J. A., Bishop, J. E., Hisatake, J. I., Koeffler, H. P., Peleg, S. (2000) Characterization of a novel analogue of 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> with two side chains: interaction with its nuclear receptor and cellular actions *J. Med. Chem.* **43**,2719-2730
- 33) Rachez, C., Freedman, L. P. (2000) Mechanisms of gene regulation by vitamin D<sub>3</sub> receptor: a network of coactivator interactions *Gene* **246**,9-21
- 34) Rots, N. Y., Liu, M., Anderson, E. C., Freedman, L. P. (1998) A differential screen for ligand-regulated genes: identification of HoxA10 as a target of vitamin D<sub>3</sub> induction in myeloid leukemic cells *Mol. Cell. Biol.* **18**,1911-1918
- 35) Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, E., et al (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* John Willey and Sons New York, NY.
- 36) Pahl, H. L., Burn, T. C., Tenen, D. G. (1991) Optimization of transient transfection into human myeloid cell lines using a luciferase reporter gene *Exp. Hematol.* **19**,1038-1041
- 37) Rots, N. Y., Iavarone, A., Bromleigh, V., Freedman, L. P. (1999) Induced differentiation of U937 cells by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> involves cell cycle arrest in G<sub>1</sub> that is preceded by a transient proliferative burst and an increase in cyclin expression *Blood* **93**,2721-2729
- 38) Wang, X., Studzinski, G. P. (2001) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) defines the first phase of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced differentiation of HL60 cells *J. Cell. Biochem.* **80**,471-482
- 39) Zhang, D. E., Hetherington, C. J., Gonzalez, D. A., Chen, H. M., Tenen, D. G. (1994) Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> *J. Immunol.* **153**,3276-3284
- 40) Koszewski, N. J., Reinhardt, T. A., Horst, R. L. (1999) Differential effects of 20-epi vitamin D analogs on the vitamin D receptor homodimer *J. Bone Miner. Res.* **14**,509-517
- 41) Carlberg, C., Quack, M., Herdick, M., Bury, Y., Polly, P., Toell, A. (2001) Central role of VDR conformations for understanding selective actions of vitamin D<sub>3</sub> analogues *Steroids* **66**,213-221

- 42) Kreutz, M., Andreesen, R. (1990) Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3 *Blood* **76**,2457-2461
- 43) Watanabe, M., Shimamoto, Y., Matsumoto, T., Yoshida, S., Kohashi, O., Sunaga, T. (1996) Effects of interferon-alpha, beta, and gamma on the function of differentiated leukemic HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 *J. Interferon Cytokine Res.* **16**,347-356
- 44) Koeffler, H. P., Reichel, H., Bishop, J. E., Norman, A. W. (1985) Gamma-interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**,596-603
- 45) Nakamaki, T., Kawakami, K., Sato, S., Hino, K., Tomoyasu, S., Tsuruoka, N., Honma, Y., Hozumi, M. (1992) The role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in induction of monocytic differentiation of HL-60 cells: synergistic interaction with 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and interferon-gamma in inducing interleukin-1 beta *Anticancer Res.* **12**,1331-1337
- 46) Boyer, A., Andreu, G., Romet-Lemonne, J. L., Fridman, W. H., Teillaud, J. L. (1999) Generation of phagocytic MAK and MAC-DC for therapeutic use: characterization and in vitro functional properties *Exp. Hematol.* **27**,751-761
- 47) Wallace, P. K., Romet-Lemonne, J. L., Chokri, M., Kasper, L. H., Fanger, M. W., Fadul, C. E. (2000) Production of macrophage-activated killer cells for targeting of glioblastoma cells with bispecific antibody to FcgammaRI and the epidermal growth factor receptor *Cancer Immunol. Immunother.* **49**,493-503
- 48) James, S. Y., Williams, M. A., Newland, A. C., Colston, K. W. (1999) Leukemia cell differentiation: cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D *Gen. Pharmacol.* **32**,143-154
- 49) Takeshita, A., Ozawa, Y., Chin, W. W. (2000) Nuclear receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements *Endocrinology* **141**,1281-1284
- 50) Berry, D. M., Meckling-Gill, K. A. (1999) Vitamin D analogs, 20-epi-22-oxa-24a,26a,27a,-trihomo-1alpha,25(OH)2-vitamin D3, 1,24(OH)2-22-ene-24-cyclopropyl-vitamin D3 and 1alpha,25(OH)2-lumisterol3 prime NB4 leukemia cells for monocytic differentiation via nongenomic signaling pathways, involving calcium and calpain *Endocrinology* **140**,4779-4788

- 51) Kaneki, M., Kharbanda, S., Pandey, P., Yoshida, K., Takekawa, M., Liou, J. R., Stone, R., Kufe, D. (1999) Functional role for protein kinase C $\beta$  as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells *Mol. Cell. Biol.* **19**,461-470
- 52) Kawase, T., Orikasa, M., Oguro, A., Burns, D. M. (1998) Up-regulation of inducible nitric oxide (NO) synthase and NO production in HL-60 cells stimulated to differentiate by phorbol 12-myristate 13-acetate plus 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is not obtained with dimethylsulfoxide plus 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> *Calcif. Tissue Int.* **63**,27-35
- 53) Vidal, S. M., Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S., Gros, P. (1996) Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains *J. Immunol.* **157**,3559-3568
- 54) Searle, S., Blackwell, J. M. (1999) Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility *J. Med. Genet.* **36**,295-299
- 55) Veldman, C. M., Cantorna, M. T., DeLuca, H. F. (2000) Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in the immune system *Arch. Biochem. Biophys.* **374**,334-338
- 56) Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data *Nucleic Acids Res.* **23**,4878-4884
- 57) Prestridge, D. S. (1991) SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements *Comput. Appl. Biosci.* **7**,203-206
- 58) Wingender, E. (1988) Compilation of transcription regulating proteins *Nucleic Acids Res.* **16**,1879-1902
- 59) Ghosh, D. (1991) New developments of a transcription factors database *Trends Biochem. Sci.* **16**,445-447
- 60) Issa, L. L., Leong, G. M., Eisman, J. A. (1998) Molecular mechanism of vitamin D receptor action *Inflamm. Res.* **47**,451-475
- 61) Khorasanizadeh, S., Rastinejad, F. (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements *Trends Biochem. Sci.* **26**,384-390



- 62) Studzinski, G. P., McLane, J. A., Uskokovic, M. R. (1993) Signaling pathways for vitamin D-induced differentiation: implications for therapy of proliferative and neoplastic diseases *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **3**,279-312
- 63) DeLuca, H. F., Cantorna, M. T. (2001) Vitamin D: its role and uses in immunology *FASEB J* **15**,2579-2585
- 64) Penna, G., Adorini, L. (2001) Inhibition of costimulatory pathways for T-cell activation by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) *Transplant. Proc.* **33**,2083-2084
- 65) Gross, A., Dugas, N., Spiesser, S., Vouldoukis, I., Damais, C., Kolb, J. P., Dugas, B., Dornand, J. (1998) Nitric oxide production in human macrophagic cells phagocytizing opsonized zymosan: direct characterization by measurement of the luminol dependent chemiluminescence *Free Radic. Res.* **28**,179-191
- 66) Sly, L. M., Lopez, M., Nauseef, W. M., Reiner, N. E. (2001) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3-induced monocyte antimycobacterial activity is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and mediated by the NADPH-dependent phagocyte oxidase *J. Biol. Chem.* **276**,35482-35493
- 67) Le Naour, F., Hohenkirk, L., Grolleau, A., Misek, D. E., Lescure, P., Geiger, J. D., Hanash, S., Beretta, L. (2001) Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics *J. Biol. Chem.* **276**,17920-17931
- 68) Griffin, M. D., Lutz, W., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J., Kumar, R. (2001) Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**,6800-6805
- 69) Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., Zhang, D. E. (1997) Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia *Blood* **90**,489-519

## Figure Legends

Figure 1. *NRAMP1* is expressed late in the macrophage differentiation program induced by VD. (A) Time-course study of CD14 cell-surface expression by flow cytometry using viable HL-60 cells that were differentiated with 10 nM VD or the genomic agonists KH 1060 and EB 1089 (dark line) and isotype-matched control (thin line). D1, D3, and D5 indicate the time points (days after initiation of differentiation) at which analyses were performed. Histograms display cell numbers (vertical axis) and staining intensity (horizontal axis). (B) Time course of *NRAMP1* and *CD14* mRNA expression was analyzed by Northern blot at days 1–5 following induction of differentiation. Total RNA was analyzed each day during HL-60 cell differentiation induced with 10 nM VD compound. Expression of the housekeeping gene *GAPDH* is shown as control for sample loading. Hybridization signals were revealed by autoradiographic exposure with one intensifying screen. The results presented correspond to exposure length of 24 h (*NRAMP1*), 3 days (*CD14*), and 17 h (*GAPDH*).

Figure 2. IFN- $\gamma$  cooperates with EB 1089 to up-regulate *NRAMP1* mRNA accumulation. (A) Analysis of CD14 surface expression by viable cells after 3 days of differentiation induced with various treatments combining VD compound (10 nM) and IFN- $\gamma$  (100 U/ml): No treatment (NT), VD, IFN- $\gamma$ , EB 1089, VD EB 1089, IFN- $\gamma$  EB 1089. (B) Quantification of *CD14* and *NRAMP1* mRNA expression levels detected by Northern blot after signal digitalization using a PhosphorImager. (C) Determination of *NRAMP1* (top), *CD14* (middle), and *GAPDH* (bottom) mRNA stability in HL-60 cells differentiated for 3 days with KH 1060 and further treated with actinomycin D for the time indicated. mRNA levels were detected by Northern analysis.

Figure 3. Analysis of *NRAMP1* gene expression induced by VD alone or in combination with various compounds including modulators of VDR activity. Agents that can modulate VDR activity directly through homo- and heterodimerization include the agonists of VD genomic effects (KH and EB) and the retinoids ATRA and 9 cis-RA. JN and HL represent one agonist and one antagonist of VD nongenomic effects, which act on

signaling pathways independent of the VDR and can influence cell differentiation. PMA and IFN- $\gamma$  represent potent transcriptional stimulators that are known to enhance VD-induced differentiation. (A) Northern blots were performed using probes for *NRAMP1*, *CD14*, and *GAPDH* genes, and hybridization signals were detected after exposure with one intensifying screen for 96 h, 48 h, and 17 h, respectively. (B) Hybridization signals were quantified after digitalization using a PhosphorImager.

Figure 4. Microscopic evaluation of the expression of NRAMP1 protein in HL-60 cells differentiated into mononuclear phagocytes. Cells were induced to differentiate for 5 days on culture slides and were then fixed and incubated with antibodies before processing for visualization by epi-fluorescence. Some preparations were allowed to phagocytose heat-killed *C. albicans* (G, H, J). Cell preparations were differentiated in the presence of 10 nM KH and 100 U/mL IFN- $\gamma$  (A–F and J). Indirect immunofluorescence using an affinity-purified rabbit anti-NRAMP1 antibody was performed with cells that were permeabilized (A and J) or not (B), and permeabilized cells were also incubated with the control rabbit preimmune serum (C). CD14-specific cell labeling was detected by indirect immunofluorescence using the mAb 3C10 and differentiated cells that had been permeabilized (D) or not (E), whereas negative control was performed using only the secondary anti-mouse antibody and permeabilized cells (F). Cells differentiated in the presence of KH and PMA were also analyzed after fixation and permeabilization (G–I). Phase-contrast image (G) and the corresponding immunofluorescence micrograph (H) show that a phagocytosed particle, indicated by a large arrow (black in G and white in H), is decorated by NRAMP1-specific immunofluorescence. The intracellular pattern of NRAMP1-specific fluorescence observed after phagocytosis is different from the pattern observed in cells that have not ingested particles (H, I). Similar difference of intracellular distribution of NRAMP1 protein localization could be observed after phagocytosis by cells differentiated with KH and IFN- $\gamma$  (compare A and J; original magnification, x400). (K) Western blot of crude membrane preparations obtained from transfected U-937 cells expressing a NRAMP1-c-Myc-tagged construct.

Figure 5. Tissue-specific, transcriptional up-regulation of the *NRAMP1* gene during VD-induced differentiation. Transcriptional fusions were obtained by ligation of *NRAMP1*

promoter fragments to the ORF encoding the luciferase from pGL3 basic plasmid, using an *NcoI* site overlapping the ATG. A fragment extending 263 bp upstream of *NRAMP1* ATG was inserted in AS and S orientations, and longer fragments extending 588 bp (M), 647 bp (L), and ~3.6 kb (dL) upstream of the ATG were inserted in the sense orientation. Transcriptional activity was studied after electroporation of the constructs together with control plasmid pXP2 hGH in cells undifferentiated (ND) or differentiated for 3 days with KH VD. RLU/s were normalized for transfection efficiency measured by the production of GH. The fold induction observed between untreated and differentiated cells is indicated on the right side of the figure. (A) Schematic representation of the luciferase constructs used and transcriptional activity of the *NRAMP1* gene in HL-60 cells and in HL-60 cells differentiated with KH VD. At least three independent experiments were performed for each condition, and the mean and standard error of the mean are presented. Statistical significance was determined by pairwise Student's *t*-tests and is indicated by \* ( $P<0.05$ ) and \*\* ( $P<0.01$ ). (B) RLU/s measured after transfection of *NRAMP1* gene constructs in Jurkat cells untreated or incubated for 3 days with KH VD. The data presented correspond to one experiment that is representative of three independent experiments. (C) *NRAMP1* promoter transcriptional activity in 293-T cells. The data are representative of two independent experiments. (Note: The cell lines displayed important differences in transfection efficiency. The values presented on the graph were normalized to the expression levels measured in HL-60, using the activity measured with the construct AS as an index. The actual values of RLU/s obtained with 293-T cells were 100-fold higher, and those obtained with Jurkat cells were fourfold higher than those indicated.)

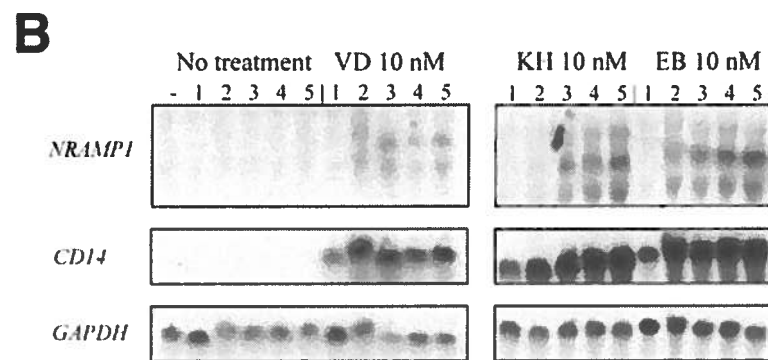
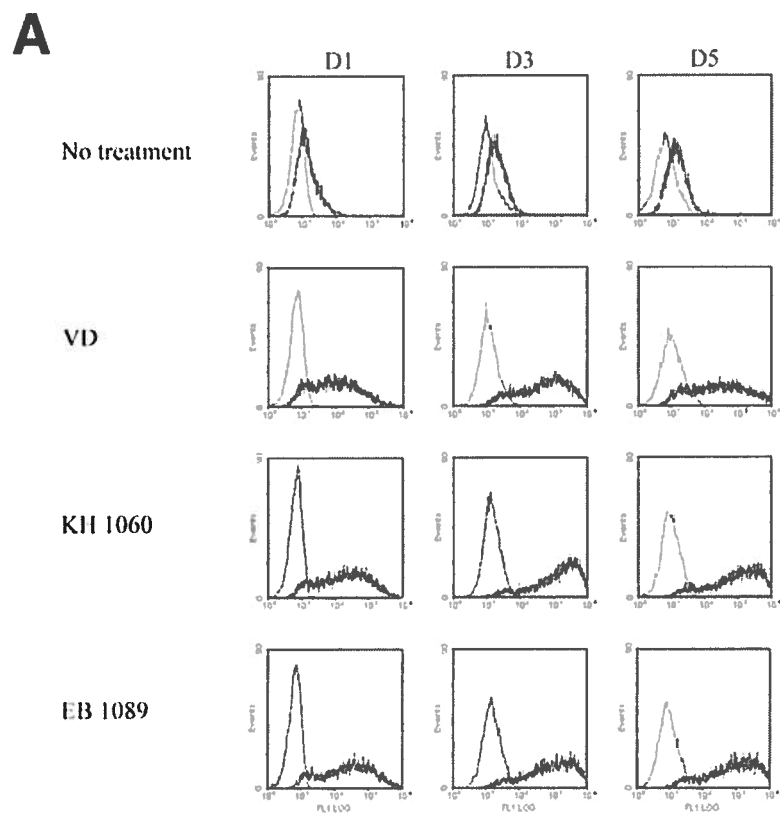
Figure 6. Transcriptional activation of a fragment of the *NRAMP1* promoter during VD-induced differentiation in stable transfectants. The VD-responsive transcriptional fusion of the plasmid pGL3NR1L was inserted into the integrative vector Sr $\alpha$ -puro and then used to generate stable transfectants expressing luciferase. (A) Three independent clones show higher levels of induction in response to the VDM genomic analogs KH and EB. (B) Kinetics of induction in clone HSRL5 show that significant expression of the gene occurs at about day 2 following induction. The combination of IFN- $\gamma$  and VD or EB has additive effects on the expression, and the expression levels induced by IFN- $\gamma$  alone

appear superior to those induced with the VD genomic analogs. (C) The induction of luciferase activity in clone HSRL5 in response to VD and KH is dose-dependent. VD induction peaks around  $10^{-7}$ – $10^{-6}$ , and KH induction peaks at  $10^{-8}$  M. JN used alone does not induce significant activation of the promoter. IFN- $\gamma$  induces time- and dose-dependent activation of the *NRAMP1* promoter, and combination of IFN- $\gamma$  with KH has additive effects. The mean  $\pm$  SE of three (A), four (B), and three (C) independent experiments is presented.

Figure 7. Absence of correlation between the transcriptional activation of the *NRAMP1* 647-bp promoter fragment and the accumulation of *NRAMP1* mRNA in response to IFN- $\gamma$ . The clone HSRL5 was used in these analyses in which half of the cells treated was used for Northern blot analysis and mRNA signal quantification (A and C, respectively), and the other half was used to prepare cell extracts for total protein determinations and luciferase measurements (B).

# Figures

## Figure 1



**Figure 2**

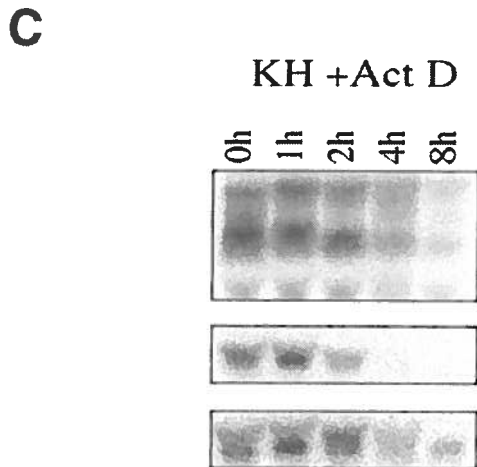
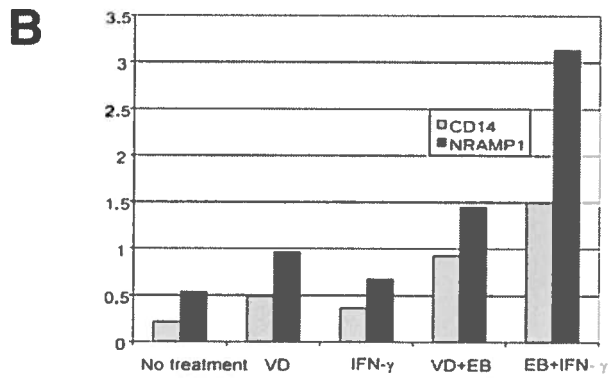
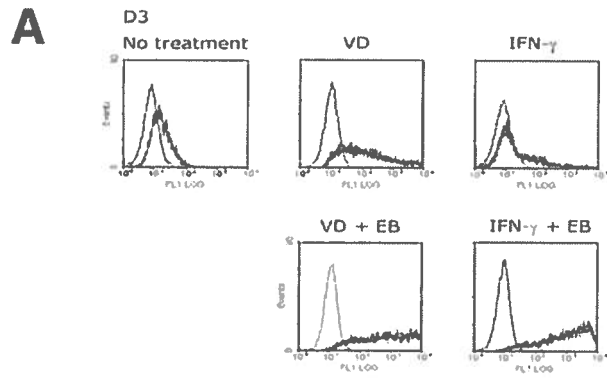
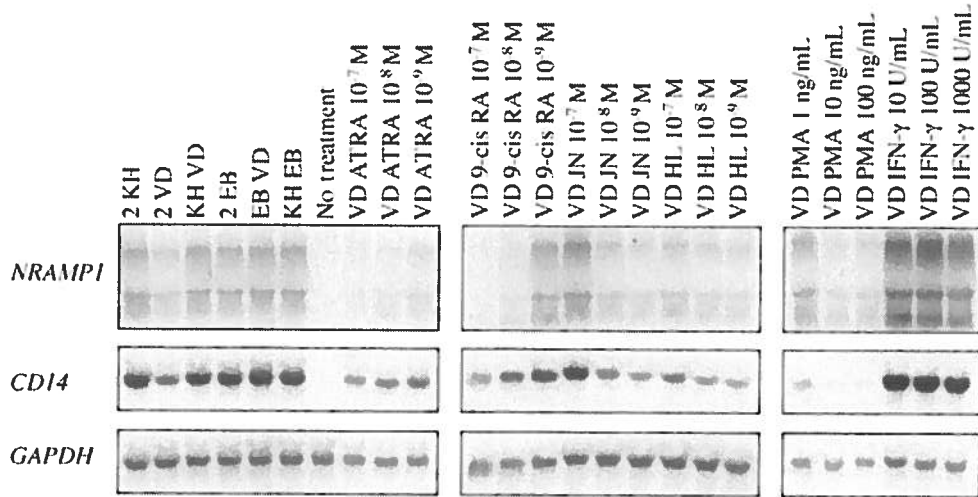
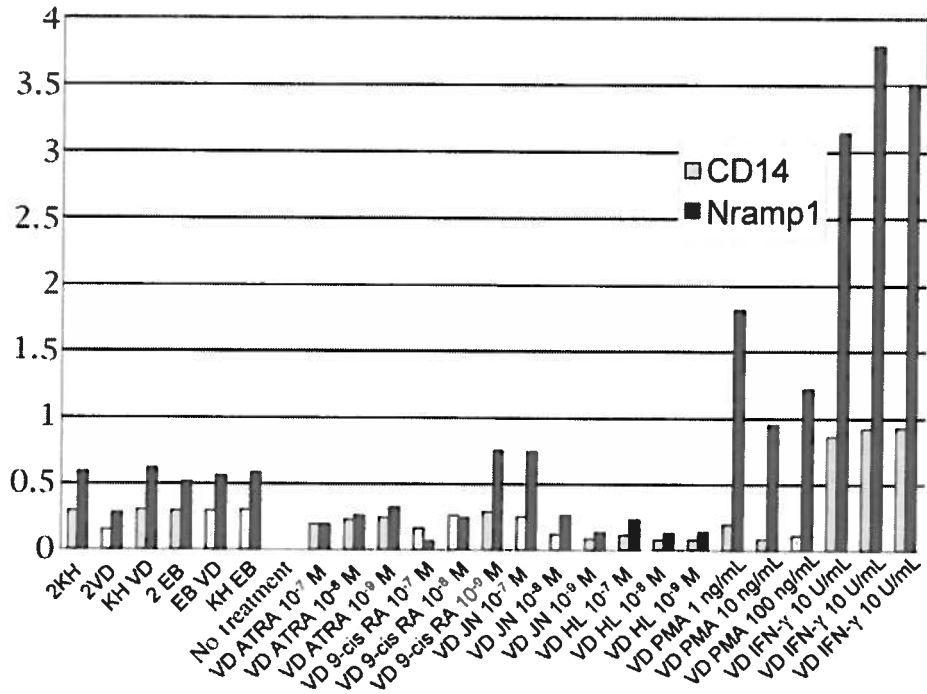


Figure 3

**A**

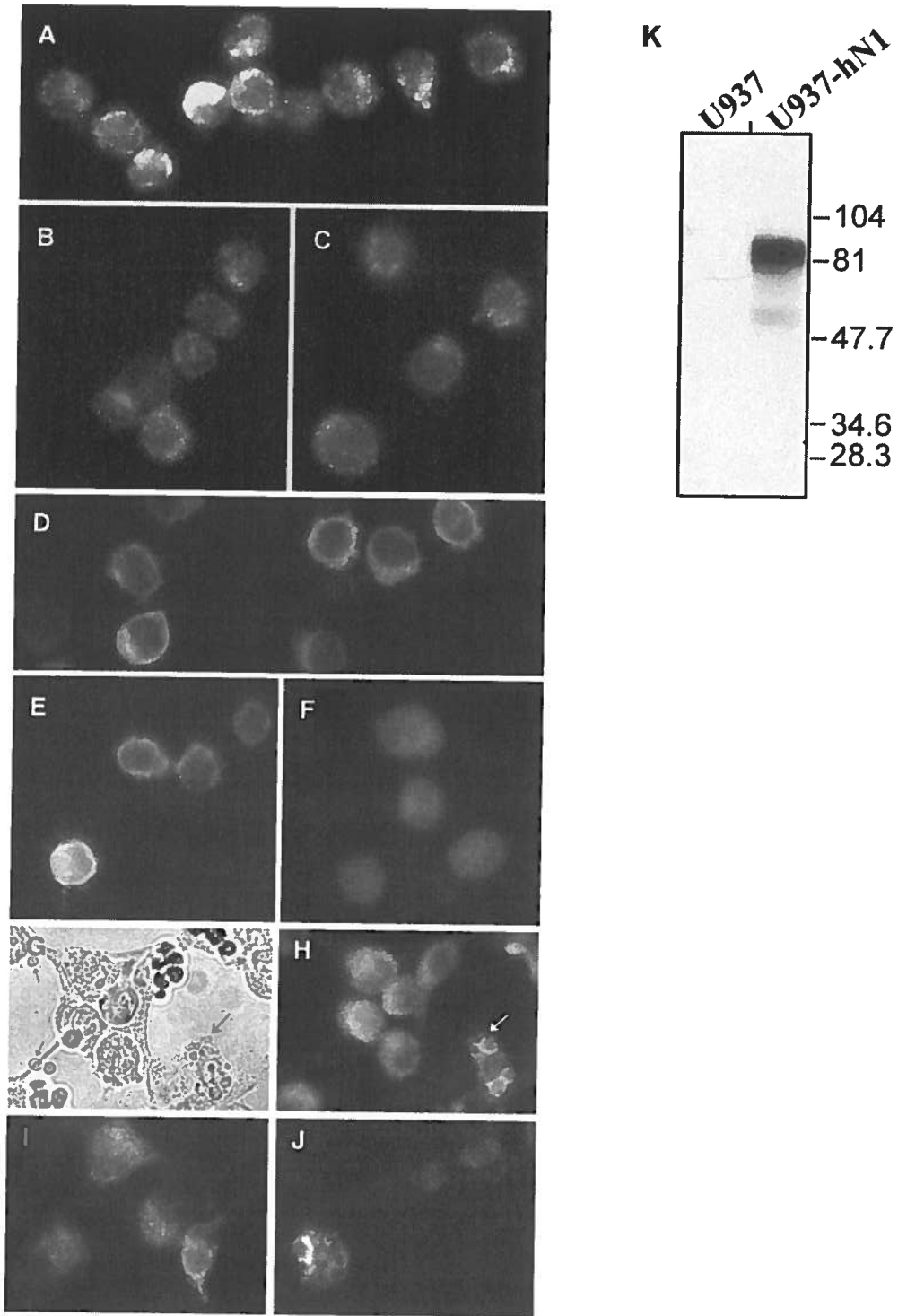


**B**

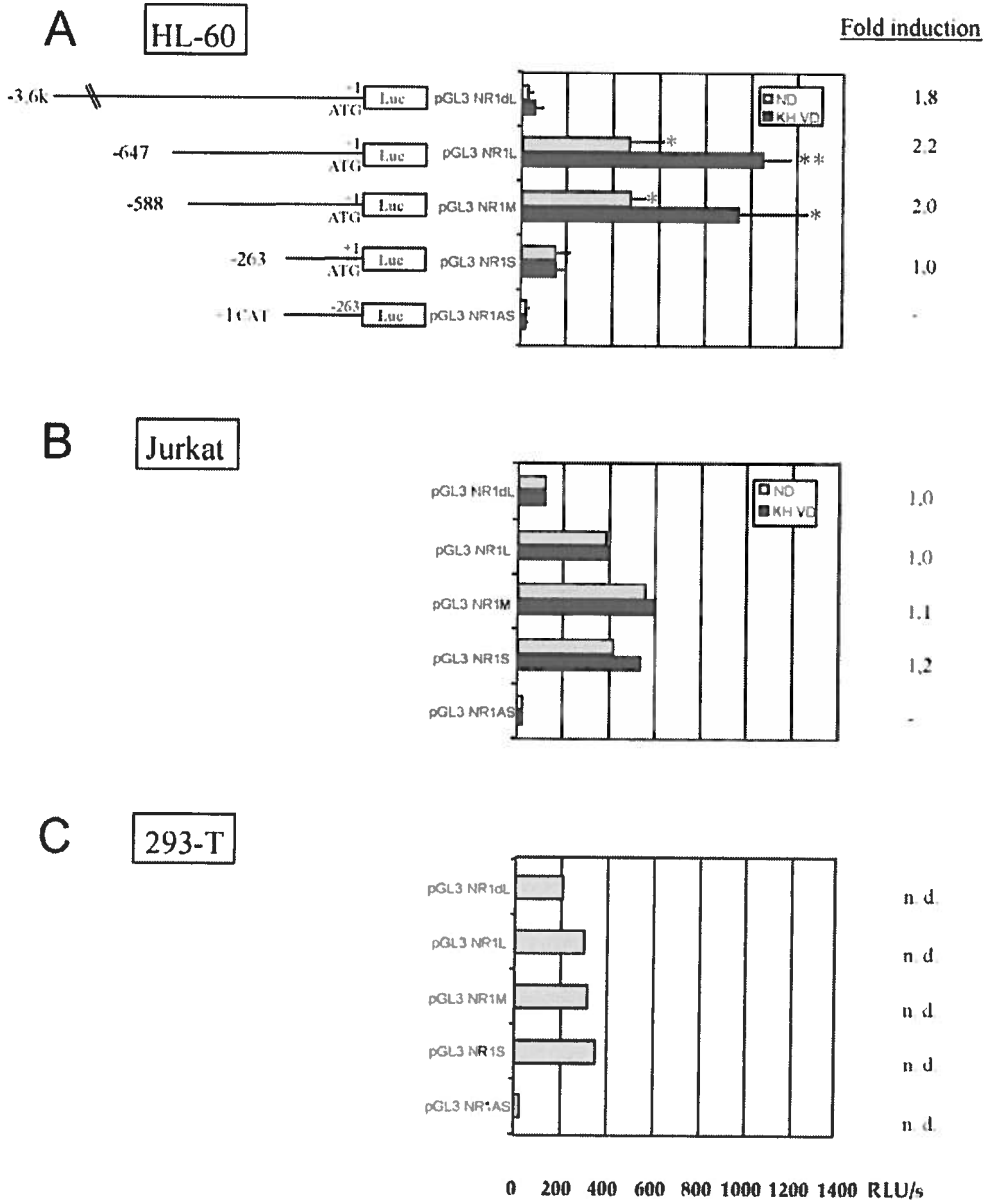




**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

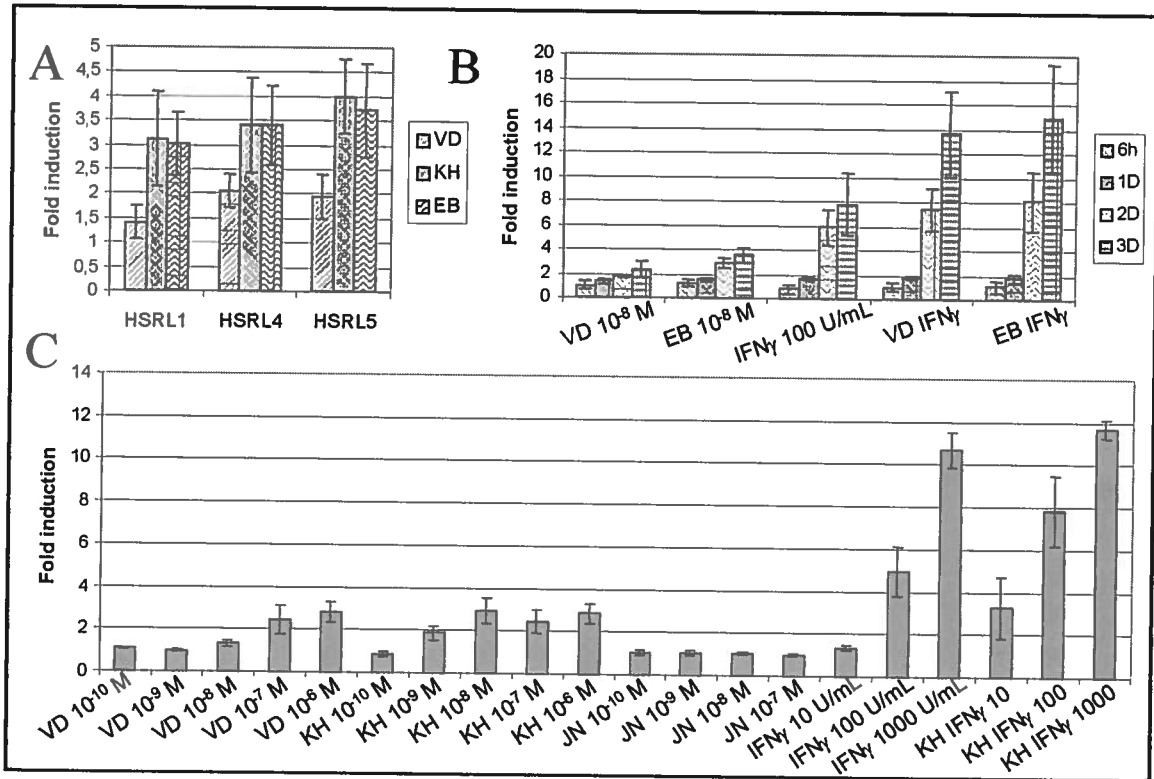
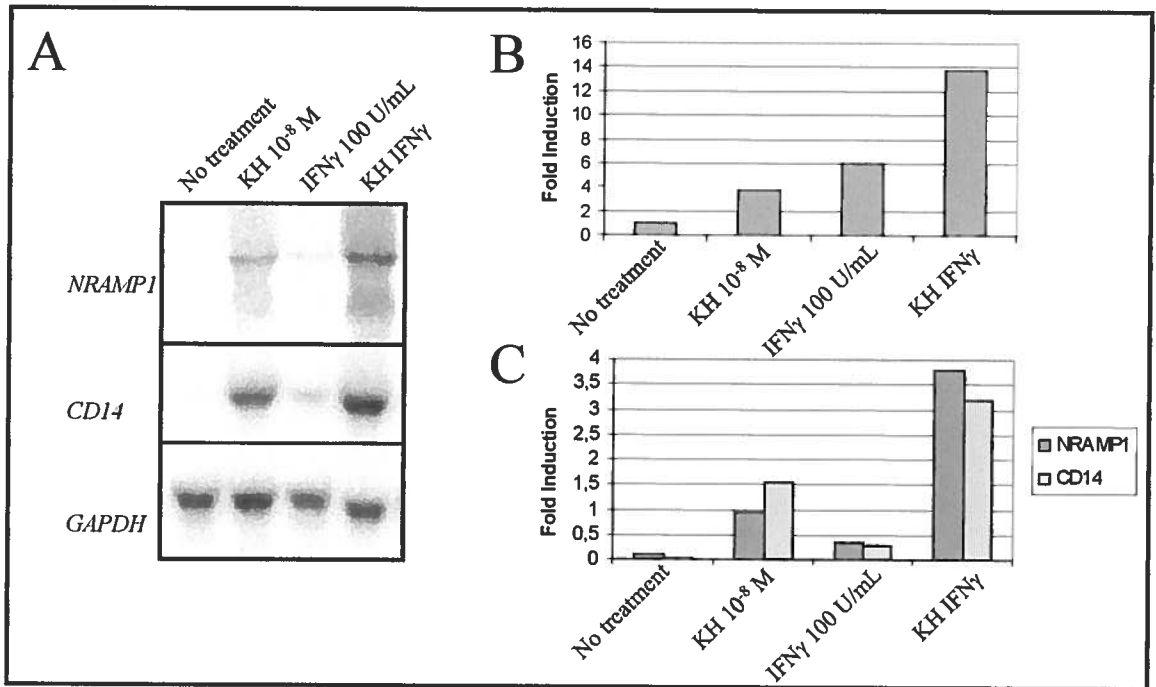


Figure 7



## Chapitre 3: Deuxième article

Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules

### *Mise en contexte du second article*

Parmi les cellules du tissu sanguin, les cellules polymorphonucléaires représentent la principale source d'expression suivies par les monocytes circulants. L'expression est également plus forte dans les macrophages alvéolaires comparativement aux monocytes. De plus, la différenciation granulocytaire de la lignée cellulaire HL-60 induite par le DMSO permet l'expression du messager (Cellier *et al.* 1997). Il était alors connu que chez le macrophage la protéine NRAMP1 était exprimée dans la membrane de vésicules LAMP1 positives et relocalisées au phagosome suite à la phagocytose (Gruenheid *et al.* 1997; Roig *et al.* 2002). L'expression et la localisation de la protéine chez les granulocytes restaient cependant à confirmer. Étant donné le rôle important des granulocytes dans la phagocytose des pathogènes et le rôle joué dans la résistance naturelle de l'hôte par *NRAMP1*, il apparaissait donc intéressant de définir la localisation de NRAMP1 dans ces cellules.

Un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine NRAMP1 fut produit en collaboration avec l'équipe du Dr Philippe Gros. Afin de confirmer la spécificité de ces anticorps, j'ai transfecté la lignée cellulaire U-937 avec une construction permettant l'expression stable de NRAMP1 avec un épitope c-myc à son extrémité c-terminale et j'ai préparé des extraits membranaires avec un des clones obtenus. Ces anticorps furent utilisés pour détecter la protéine endogène dans des cellules explantées et dans la lignée HL-60 (Fig.6 et (Roig *et al.* 2002)). Puisque nous (E.Richer, E.Roig) avons démontré dans les cellules HL-60 différenciées en type monocyttaire que NRAMP1 est relocalisées à la membrane des phagosomes après un repas phagocytaire, j'ai ici déterminé la localisation de NRAMP1 dans les cellules HL-60 différenciées en neutrophiles (Fig.7) par immunofluorescence *in situ* et microscopie confocale. La localisation de la protéine dans les granules tertiaires fut effectuée par Western blot par l'équipe du Dr Gros en collaboration avec le Dr Neils Borregaard. L'expression de la protéine dans les

granulocytes extraits du sang périphérique fut confirmée par microscopie électronique par l'équipe du Dr Borregaard.

## ***Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules***

**François Canonne-Hergaux, Jero Calafat, Etienne Richer, Mathieu Cellier, Sergio Grinstein, Neils Borregaard, and Philippe Gros**

From the Department of Biochemistry, Center for the Study of Host Resistance, McGill Cancer Center, McGill University, Montreal, QC, Canada; the Division of Cell Biology, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands; INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, QC, Canada; the Division of Cell Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada; and the Department of Hematology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

### **Abstract**

Mutations at the *Nramp1* gene cause susceptibility to infections with intracellular pathogens. In human blood, polymorphonuclear (PMN) leukocytes are the most abundant site of *NRAMP1* messenger RNA (mRNA) expression, suggesting that NRAMP1 plays an important role in the activity of these cells. By Northern blot analysis, *NRAMP1* mRNA was only detected in most mature neutrophils from bone marrow (band and segmented cells). A high-affinity polyclonal rabbit antihuman NRAMP1 antibody directed against the amino terminus of the protein was produced and used to study cellular and subcellular localization of the protein in primary human neutrophils. Subcellular fractionation of granule populations together with immunoblotting studies with granule-specific markers indicate that NRAMP1 expression is primarily in tertiary granules. These granules are positive for the matrix enzyme gelatinase and the membrane subunit of the vacuolar H<sup>+</sup>/ATPase and can be recruited for exocytosis by treatment of neutrophils with phorbol myristate acetate. Immunogold studies by cryoelectron microscopy with primary neutrophils confirm that a majority (75%) of NRAMP1-positive granules are also positive for gelatinase, but they also suggest further heterogeneity in this granule population. Presence of NRAMP1 in tertiary granules is in agreement with the late-stage appearance of *NRAMP1* mRNA during neutrophil maturation in bone marrow. Finally,

immunofluorescence studies of *Candida albicans*-containing phagosomes formed in neutrophils indicate that NRAMP1 is recruited from tertiary granules to the phagosomal membrane on phagocytosis, supporting a role for NRAMP1 in the antimicrobial defenses of human neutrophils. (Blood. 2002;100:268-275)



## Introduction

In the mouse, naturally occurring<sup>1</sup> or experimentally introduced mutations<sup>2</sup> at the *Nramp1* gene cause susceptibility to infection with several unrelated intracellular parasites such as *Salmonella*, *Leishmania*, and *Mycobacterium* (reviewed by Skamene et al<sup>3</sup>). These mutations impair the ability of macrophages to restrict intracellular replication of these microbes, suggesting an important role of the Nramp1 protein in bacteriostatic or bactericidal defense mechanisms of these cells.<sup>4</sup> *Nramp1* messenger RNA (mRNA) is expressed in primary mouse macrophages and in J774 and RAW297 macrophage cell lines, where its expression can be strongly induced by exposure to interferon- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide.<sup>5</sup> Sequence analysis indicates that Nramp1 is an integral membrane protein composed of 12 transmembrane domains, which define a superfamily of divalent cation transporters that has been highly conserved during evolution from bacteria to humans (reviewed by Cellier et al<sup>6</sup> and Forbes and Gros<sup>7</sup>). Nramp1 protein is expressed in the membrane fractions of mouse macrophages,<sup>8</sup> and subcellular localization studies by immunofluorescence indicate that it is present in the Lamp-1-positive compartment of these cells.<sup>9,10</sup> Double-immunofluorescence experiments together with biochemical studies in purified vesicles indicate that on phagocytosis Nramp1 is rapidly recruited to the membrane of phagosomes containing inert particles such as latex beads<sup>9</sup> and zymosan<sup>11</sup> or live bacteria such as *Salmonella* and *Yersinia*.<sup>4</sup> Although the mechanism of action of Nramp1 at the phagosomal membrane remains debated (reviewed by Forbes and Gros<sup>7</sup>), recent studies show that it functions as a divalent cation transporter.<sup>11-13</sup> In particular, microfluorescence-imaging experiments in live macrophages allowed to internalize zymosan particles labeled with metal-sensitive fluorescent dyes show that Nramp1 mediates active, pH-dependent efflux of divalent cations ( $Mn^{2+}$ ) from the luminal space of the phagolysosome.<sup>11</sup> It has been proposed that removal of divalent cations essential for microbial survival and replication may account for the pleiotropic effect of *Nramp1* mutations on different intracellular pathogens.<sup>7</sup>

In humans, population-based association studies and linkage analyses in multigeneration pedigrees have demonstrated an association between polymorphic variants at *NRAMP1*

and susceptibility to tuberculosis and leprosy in endemic areas of disease and in the outbreak situation.<sup>14-17</sup> Additional reports have also suggested association of *NRAMP1* polymorphisms with inflammatory diseases in humans such as rheumatoid arthritis<sup>18-20</sup> and Crohn disease.<sup>21</sup> Interestingly, functional polymorphisms have been identified in the promoter of the *NRAMP1* gene in the form of sequence variations in a Z-DNA-forming dinucleotide repeat.<sup>22</sup> These polymorphisms define a 4-allele system that shows significant functional properties in transcriptional activity with reporter genes.<sup>22</sup> Searle and Blackwell<sup>22</sup> proposed a hypothesis in which chronic activation of the *NRAMP1* promoter in allele 3 of this polymorphism is associated with autoimmune disease susceptibility, while showing a protective effect against infectious diseases. The reverse would be true for the low-expressing allele 2 at *NRAMP1*.

Human *NRAMP1* mRNA is expressed in lungs, spleen, and liver but is highest in peripheral blood leukocytes.<sup>23,24</sup> There, polymorphonuclear leukocytes represent by far the major site of *NRAMP1* mRNA expression followed to a lesser degree by monocytes. Migration of monocytes to tissues (alveolar macrophages) or maturation in vitro is associated with increased *NRAMP1* expression compared with blood monocytes.<sup>24</sup> Studies in the promyelocytic leukemia cell line HL-60 indicate that differentiation toward either the monocytic pathway (with vitamin D<sub>3</sub> and phorbol ester) or the granulocyte pathway (dimethylformamide, dimethyl sulfoxide [DMSO]) is concomitant to strong induction of *NRAMP1* mRNA expression.<sup>24</sup> Together, these results have suggested that *NRAMP1* may play an important role in the antimicrobial response or inflammatory process mediated by polymorphonuclear (PMN) leukocytes.

Both PMN leukocytes and macrophages are capable of engulfing and destroying microorganisms by the action of toxic radicals, ions, and proteolytic enzymes produced by these cells. Neutrophils contain different types of granules that can be recruited for release by exocytosis or for fusion to phagosomes containing ingested particles.<sup>25</sup> These granules are divided into 3 or 4 subtypes, depending on the purification method used to isolate them. The biochemical properties and content of bactericidal species of these granules have been extensively characterized in human neutrophils (reviewed in Borregaard et al<sup>26</sup>). Simple separation by sedimentation on density gradients yields

4 major fractions: a cytosolic soluble fraction, a PM/secretory vesicle fraction (positive for alkaline phosphatase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate [NADPH] oxidase), a specific granule fraction (secondary and tertiary granules, positive for lactoferrin and vitamin B<sub>12</sub> binding protein), and the azurophil granules (positive for myeloperoxidase and  $\beta$ -glucuronidase).<sup>27</sup> In addition, recruitment of particular granules for exocytosis after stimulation follows established kinetics.<sup>28</sup>

The role of the NRAMP1 protein in the antimicrobial defenses of the neutrophil remains unknown. However, the previous localization of the murine Nramp1 protein to the lysosomal compartment of macrophages<sup>9</sup> suggests that it may also be present in one or more granule populations in neutrophils. To address this issue, we have generated a polyclonal antibody against the human NRAMP1 protein and used this reagent to study cellular and subcellular localization of NRAMP1

## **Materials and methods**

### **Cell isolation procedures**

Bone marrow (BM) cells were obtained (15 mL) by aspiration from the posterior superior iliac crest from healthy volunteers as described.<sup>29</sup> Procedures were approved by the institutional review board at the University of Copenhagen, and informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Following sedimentation (15-20 minutes), the clear supernatant containing leukocytes was removed, and the cells were recovered by centrifugation (200g for 10 minutes at room temperature). The pelleted cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and placed over a 2-layer Percoll gradient of densities 1.065 and 1.080 g/mL. Following centrifugation (1000g for 20 minutes at 4°C), 3 cell bands can be recovered: "band 1" containing band and segmented cells; "band 2" containing myelocytes and metamyelocytes; and "band 3" containing myeloblasts and promyelocytes.<sup>29</sup> The distribution of the neutrophils precursors in the 3 bands was assessed by differential counting of cytopsin preparations. Mature neutrophils were isolated from peripheral blood anticoagulated in acid-citrate dextrose. Erythrocytes were sedimented by centrifugation on 2% Dextran T-500, and the leukocyte-rich supernatant was pelleted and resuspended in saline for subsequent centrifugation on Lymphoprep (Nyegaard, Oslo, Norway) at 400g for 30 minutes to separate polymorphonuclear cells from platelets and mononuclear cells.<sup>30</sup>

### **Cell culture**

Chinese hamster ovary (CHO) LR73, the promyelocytic leukemia-derived HL-60, and the macrophagelike histiocytic lymphoma U937 cells were cultured as previously described.<sup>23,31</sup> HL-60 cells were induced to differentiate into granulocyte by the presence of 1.25% DMSO in the culture medium for 6 days. Differentiation was monitored by using flow cytometry to follow surface expression of CD11b. CHO and U937 cells were transfected with a human *NRAMP1* complementary DNA (cDNA) modified by the in-frame addition of a c-Myc tag at the carboxy terminus of the protein. Crude membrane

fractions were prepared from control CHO and U937 cells and from CHO-NRAMP1-c-Myc and U937-NRAMP1-c-Myc as previously described.<sup>31</sup>

### **RNA isolation and Northern blotting**

Total cellular RNA was extracted from the different BM cell populations by a single-step procedure.<sup>32</sup> The *NRAMP1* hybridization probe was a 1.2-kilobase (kb) cDNA fragment corresponding to positions -120 to +1120 of the published sequence.<sup>23</sup> Control hybridization probe for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was produced and used exactly as described.<sup>29</sup> The membrane was washed for 2 × 15 minutes at 60°C in 2 × sodium chloride/sodium citrate (SSC; 1 × SSC is 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0) 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) followed by 2 × 15 minutes in 0.2 × SSC, 0.5% SDS. The membrane was stripped by boiling in 0.1% SDS before rehybridization.

### **Subcellular fractionation**

Neutrophils were resuspended in Krebs-Ringer phosphate (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.27 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.95 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4) at 3 × 10<sup>7</sup> cells/mL and divided into 2 equal portions. One portion was kept on ice as control, the other was stimulated at 37°C for 15 minutes with 2 µg/mL phorbol myristate acetate (PMA). The stimulation was stopped by adding 2 volumes of ice-cold buffer. Control and stimulated cells were sedimented at 200g for 10 minutes and resuspended in ice-cold buffer before subcellular fractionation. Individual granule fractions were purified from resting and PMA-stimulated neutrophils exactly as previously described.<sup>33</sup> Briefly, neutrophils were subjected to nitrogen cavitation followed by centrifugation to remove nuclei and unbroken cells. The resulting postnuclear supernatant was applied on top of a discontinuous, 3-layer Percoll gradient (1.050/1.09/1.12 g/mL) and centrifuged at 37 000g for 30 minutes at 4°C. Gradients were aspirated from the bottom through a peristaltic pump attached to a fraction collector set to deliver 1 mL in each fraction. Fractions 1 to 6, 7 to 12, 13 to 18, and 19 to 24 were pooled in 4 distinct populations. Percoll was removed by centrifugation, and the biologic material was resuspended in 1 mL PBS. Aliquots of each sample were assayed for the presence of marker proteins corresponding

to individual compartments (indicated in parenthesis): myeloperoxidase ( $\alpha$  band/azurophilic or primary granules), lactoferrin ( $\beta$ 1 band/specific or secondary granules), gelatinase ( $\beta$ 2 band/gelatinase or tertiary granules), and albumin ( $\gamma$  band; secretory vesicles).<sup>28</sup>

### **Production and purification of NRAMP1 antibodies**

A glutathione-S-transferase (GST) fusion protein was constructed by subcloning in plasmid vector pGEX (Pharmacia, Montreal, QC, Canada) a *NRAMP1* N-terminal cDNA sequence (nucleotides 1 to 177, corresponding to amino acids 1 to 59; GST-59NT) obtained by PCR amplification from full-length *NRAMP1* cDNA template using oligonucleotides 5HF (5'TCG GAT CCT CAA TGA CAG GTG AC-3') and 5HR (5'-TAG AAT TCG CAG GCT GAA GGT G-3'). The PCR product was digested with *Bgl*II and *Eco*RI (restriction enzymes sites are underlined in the oligonucleotide sequence), prior to subcloning into pGEX-2 digested with *Bam*HI and *Eco*RI to create the in-frame GST fusion. The fusion proteins were produced in *Escherichia coli* as previously described.<sup>31</sup> Approximately 0.4 to 0.8 mg GST-59NT protein was injected in New Zealand white male rabbits as previously described.<sup>8</sup> The polyclonal antiserum was then purified by an affinity chromatography protocol against the same NRAMP1 peptide segment (1-59 aas) fused to dihydrofolate reductase (DHFR), as previously described.<sup>31</sup>

### **Immunofluorescence and immunocytochemistry**

Cells were fixed with Bouin solution for 20 minutes and permeabilized (or not) with Triton-X100 (0.1% in PBS) for 10 minutes. Cells were incubated at 20°C in blocking solution (bovine serum albumin [BSA] 1%, 10% heat-inactivated goat serum for CHO cells or BSA 1%, 20% heat-inactivated donkey serum for HL-60) for 1 hour, prior to incubation with primary antibodies for 2 hours at 20°C. Dilution of primary antibodies in blocking solution was as follows: anti-NRAMP1 antibody (rabbit polyclonal), 1/50 to 1/75 or nonimmune serum, 1/50 to 1/75. After washing with PBS-0.5% Tween 20, secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Dilution of secondary antibodies was as follows: goat Texas red-antirabbit 1/400 and donkey Alexa Fluor488-antirabbit, 1/400 (Molecular Probes). Cells were examined by using a Nikon

optical fluorescence microscope with a  $\times 60$  to  $\times 100$  objective ( $\times 600$  to  $\times 1000$  magnification) or by using a confocal microscope. For immunocytochemistry, after permeabilization with Triton X-100, CHO cells were incubated in (1%)  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS for 10 minutes to inhibit endogenous peroxidase activity. Primary antibody incubation was followed by incubation with a swine secondary antirabbit immunoglobulin G (IgG; 1/100; DAKO) for 1 hour at room temperature and subsequently with a rabbit peroxidase antiperoxidase (1/100; DAKO). Specific staining was revealed by using 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in solution. Finally, cells were counterstained with 0.1% methylene blue in PBS, dehydrated, and mounted with Permount.

### **Phagocytosis**

DMSO-differentiated HL-60 cells were seeded in Poly-D-Lysine-coated glass slides (Biocoat; BD-Falcon) and further incubated for 1 day to promote adherence. Heat-inactivated *Candida albicans* was opsonized for 15 minutes at 25°C with rabbit complement (Biotest). Cells were washed twice with PBS, and the culture medium was replaced by phagocytosis buffer (Hanks balanced salt solution with  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  [Sigma], 0.2% BSA [Fisher]) containing opsonized *C albicans* A at a cell-to-*C albicans* ratio of 1:10. Incubation was at 37°C for 30 minutes. Slides were washed and processed for light microscopy or epi-immunofluorescence.

### **Immunoblotting**

Crude membrane preparations from control CHO/U937 cells (5  $\mu\text{g}$ ) and aliquots (25  $\mu\text{g}$ ) of enriched granule fractions were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) on 10% acrylamide gels followed by transfer to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (16 hours, 4°C).<sup>31</sup> Primary antibodies were used at the following dilution: rabbit antihuman NRAM1, 1/250; mouse anti-c-Myc (9E10) 1/100; rabbit antigelatinase, 1/2500; rabbit antimyeloperoxidase, 1/2500, rabbit antihuman serum albumin, 1/2500; rabbit antilactoferrin, 1/2500; and rabbit anti- $\beta$  subunit (39 kd) of the mammalian V-type  $\text{H}^+$ -ATPase, 1/400.

## **Electron microscopy**

Neutrophils from peripheral blood were fixed for 24 hours in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PHEM (240 mM PIPES, 100 mM HEPES, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM EGTA, pH 6.9) and then processed for ultrathin cryosectioning, as previously described.<sup>34</sup> Cryosections (45 nm) were cut at -125°C with the use of diamond knives (Drukker, Cuijk, The Netherlands) in an ultracryomicrotome (Leica Aktiengesellschaft, Vienna, Austria) and transferred with a mixture of sucrose and methylcellulose onto formvar-coated copper grids.<sup>35</sup> The grids were placed on 35-mm Petri dishes containing 2% gelatin. For immunolabeling, the sections were incubated with rabbit antihuman NRAMP-1 (1/25) for 45 minutes, followed by a 30-minute incubation with 10-nm protein A-conjugated colloidal gold (EM Lab, Utrecht University). For double immunolabeling with rabbit anti-NRAMP-1 and rabbit antigelatinase (1/300), the procedure described by Slot et al<sup>36</sup> was followed with 15- and 10-nm protein A-conjugated colloidal gold probes. After immunolabeling, the cryosections were embedded in a mixture of methylcellulose and uranyl acetate and examined with a Philips CM 10 electron microscope (Eindhoven, The Netherlands).



## Results

### NRAMP1 mRNA expression in developing polymorphonuclear leukocytes

The development of neutrophils from stem cell precursors involves different maturational steps, including the acquisition of specific granules.<sup>25</sup> The mRNAs encoding proteins present in different types of granules display a unique and sometimes diagnostic pattern of expression during the maturation process of neutrophils. For example, mRNA for myeloperoxidase, a protein present in primary/azurophil granules, appears very early in neutrophil precursors and is largely absent from mature cells, whereas the mRNAs for gelatinase (tertiary granules) and for CD35 and fMLP-R (secretory vesicles) appear late during differentiation and remain present in mature cells.<sup>29</sup> Concordance of temporal expression profiles between the mRNA for a novel granule protein and that previously established for mRNAs of matrix or membrane proteins of unique granule populations can provide initial clues on the site of expression of this novel protein. With the use of a discontinuous Percoll gradient protocol, BM cells of the neutrophil lineage can be fractionated into 3 cell populations consisting of early immature (primarily myeloblasts and promyelocytes found in band 3), late immature (primarily myelocytes and metamyelocytes found in band 2), and mature neutrophils (primarily band and segmented neutrophils found in band 1).<sup>29</sup> Total RNA was prepared from these BM populations as well as from circulating PMN leukocytes, separated by gel electrophoresis and probed with a human *NRAMP1* cDNA fragment (Figure 1A). *NRAMP1* mRNA expression was detected in circulating PMN leukocytes and also in the most mature neutrophil precursors corresponding to band 1 (Figure 1A). The apparent faster electrophoretic mobility of *NRAMP1* mRNA in the sample of band 1 cells compared with mature PMN leukocytes is due to a gel artifact that also affects migration of *GAPDH* control mRNA in the same samples. However, no *NRAMP1* expression was detectable in RNA preparations from band 2 and band 3 cells, suggesting that *NRAMP1* is not expressed in less mature cells (myeloblasts, promyelocytes, myelocytes, and metamyelocytes). These results suggest that *NRAMP1* mRNA expression occurs late in neutrophil maturation, with expression persisting in circulating PMN leukocytes. Previously, band 1 cells were shown to express

mRNAs corresponding to markers of tertiary granules and secretory vesicles (gelatinase, fMLP-R, CD35), suggesting that the NRAMP1 protein may be expressed in these granule populations.

### **Production and characterization of rabbit antihuman NRAMP1 antisera**

To further study expression and subcellular localization of the NRAMP1 protein in human neutrophils, a specific antiserum raised against the first 59 amino acid residues of NRAMP1 was developed and purified by affinity.<sup>31</sup> The specificity of the resulting antiserum was assessed by immunoblotting (Figure 2) by using membrane fractions from CHO cells or human U937 cells transfected or not with a human *NRAMP1* cDNA epitope tagged with a c-Myc antigenic peptide inserted at the C-terminus of the protein. The affinity-purified rabbit anti-NRAMP1 polyclonal antiserum specifically detected a protein species of apparent molecular mass 80 to 100 kd in the NRAMP1-transfected cells that was absent from the membrane fractions of control cells (Figure 2i-ii). NRAMP1 migrated as a broad immunoreactive species of size considerably larger than that predicted from the cDNA sequence (61 kd), suggesting that the protein is extensively modified by posttranslational modification in CHO and U937 cells, possibly by N-linked glycosylation, as previously reported for mouse *Nramp1*.<sup>8</sup> The NRAMP1 protein detected by this polyclonal antiserum displayed electrophoretic mobility characteristics identical to that observed if a mouse anti-c-Myc monoclonal antibody was used to probe the immunoblot (Figure 2Aiii), confirming the specificity of the anti-NRAMP1 antiserum. Finally, the antihuman NRAMP1 antibody produced could also recognize the NRAMP1 protein by immunohistochemistry (Figure 2Bi-ii) and by immunofluorescence (Figure 2Biii-iv) in transfected CHO cells.

### **Detection of NRAMP1 in human neutrophil granules by immunoblotting**

Granule populations were prepared from human neutrophils by separation on a 3-step discontinuous Percoll gradient.<sup>33</sup> After centrifugation, 4 bands are formed at the interface of the gradient steps; these correspond (from the bottom) to the  $\alpha$ -band, which contains primarily azurophil granules, the  $\beta$ 1-band enriched for the specific or secondary granules,

the  $\beta_2$ -band enriched for the gelatinase-positive tertiary granules, and the  $\gamma$ -band that contains secretory vesicles and plasma membranes.<sup>33</sup> One-milliliter fractions were collected from the bottom of the tube and the fractions 1 to 6, 7 to 12, 13 to 18, and 19 to 24 were pooled in 4 populations designated fractions: 1, 2, 3, and 4 (Figure 3). Biologic material from these pools (1-4) were recovered by centrifugation and were assayed for the presence of granule-specific markers by either enzyme-linked immunoassay (ELISA; Figure 3A-D) and by immunoblotting after SDS-PAGE (Figure 3E-H), using specific antibodies. The soluble matrix marker protein myeloperoxidase was used as a marker for the  $\alpha$ -band,<sup>37</sup> lactoferrin for the  $\beta_1$ -band,<sup>37</sup> gelatinase for the  $\beta_2$ -band, and human serum albumin (HSA) for the  $\gamma$ -band.<sup>38</sup> Results from both analyses were consistent and, despite some degree of overlap, showed clear enrichment of primary ( $\alpha$ -band), secondary ( $\beta_1$ -band), tertiary ( $\beta_2$ -band), and secretory vesicles ( $\gamma$ -band) in the 1-, 2-, 3-, and 4-pooled fractions, respectively (Figure 3).

The presence of NRAMP1 protein was then investigated in these fractions by immunoblotting (Figure 4). Interestingly, NRAMP1 was found expressed mostly in the  $\beta_2$ -fraction, with a small amount of immunoreactive protein detected in the  $\beta_1$ - and the  $\gamma$ -fractions (Figures 4 and 5). The anti-NRAMP1 antiserum detected a single protein species in the  $\beta_2$ -fraction of apparent electrophoretic mobility 70 to 75 kd, which migrated faster than the immunoreactive NRAMP1-c-Myc-tagged protein expressed in U937 transfected cells (80-90 kd), which was used as a positive control in these experiments. The nature of this difference remains unknown but may reflect different posttranslational modification of NRAMP1 in the 2 cells types. These results indicate that NRAMP1 is primarily expressed in the tertiary granule population. Reprobing the same immunoblot with a monoclonal antibody directed against the 39-kd  $\delta$  subunit of the vacuolar  $H^+$ /ATPase (Figure 4B), strongly suggests that both NRAMP1 and V-ATPase are coexpressed in tertiary granules of human neutrophils.

### **Effect of PMA treatment on NRAMP1-positive neutrophil granules**

Recruitment of different granule populations for exocytosis can be induced by stimulation with compounds such as PMA or fMLP and follows established kinetics. This recruitment can be used to confirm the identity of an NRAMP1-positive granule population and to determine if NRAMP1 can be delivered to the PM after fusion of this granule population. In these experiments, neutrophils were treated with  $10^{-6}$  M PMA, a treatment that has been previously established to induce recruitment of secretory vesicles and tertiary and secondary but not primary granules.<sup>28</sup> After nitrogen cavitation and granule separation on Percoll gradient, fractions were collected as 4 pools, as described in Figures 3 and 4. Such fractions were then analyzed by ELISA and immunoblotting for the presence of gelatinase (Figure 5A-B, respectively) and for other granule-specific matrix markers (data not shown). Immunoblotting data indicate that PMA treatment of neutrophils resulted in disappearance of approximately 80% of gelatinase reactivity, demonstrating tertiary granule recruitment to the plasma membrane for exocytosis (Figure 5A-B). Analysis of the same fractions with the anti-NRAMP1 antiserum (Figure 5C) indicates that PMA treatment of neutrophils results in drastic reduction of level of NRAMP1 protein in the  $\beta_2$  granule fraction in a manner and proportion very similar to that observed for the matrix marker gelatinase. These results support the contention that NRAMP1 is expressed in the membrane of PMA-recruitable, gelatinase-containing tertiary granules. Interestingly, disappearance of NRAMP1 from the tertiary granules was not accompanied by a concomitant appearance of NRAMP1 in the plasma membrane/secretory vesicles-containing  $\gamma$  fraction (Figure 5A), as has been previously observed for other membrane proteins.<sup>39</sup> These results suggest the possibility that NRAMP1 may not be stable at the plasma membrane.

### **Electron microscopy detection of NRAMP1 in human neutrophils**

The subcellular localization of NRAMP1 was also examined by immunoelectron microscopy. For this examination, human neutrophils were harvested and 45-nm thin cryosections were incubated with the rabbit anti-NRAMP1 polyclonal antiserum (Figure 6A), and specific immune complexes were revealed with protein A-conjugated colloidal gold (10-nm particles). Although few gold particles were detected, immunoreactive

NRAMP1 was found associated with granules in neutrophils (arrows in Figure 6A) but was absent from the cytosol or from the nucleus and mitochondria. Interestingly, gold particles were found at the membrane but not in the matrix, in agreement with the fact that NRAMP1 is an integral membrane protein, and thus possibly expressed in the membrane of neutrophil granules. As results in Figures 1, 4, and 5 strongly suggested that NRAMP1 may localize to tertiary granules, additional double-labeling experiments were carried out. In this case, NRAMP1 was labeled with 15-nm gold particles, and gelatinase was revealed with a specific antibody coupled to 10-nm gold particles. In these experiments, several granules could be seen heavily labeled by the antigelatinase antibody (Figure 6B; small arrows). Labeling appeared to be in the lumen of the granule in agreement with the known matrix location of this protein in tertiary granules. Although a large proportion of granules were positive for gelatinase only (96 of 115, ~83%; see "Discussion"), the majority (14 of 19, ~75%) of NRAMP1-positive granules were also positive for gelatinase (Figure 6B; large arrows), in agreement with the proposal that NRAMP1 is present in gelatinase granules. Interestingly, a subpopulation of NRAMP1-positive granules (5 of 19; ~25%) were negative for gelatinase (Figure 6B), suggesting that NRAMP1 can also be present in gelatinase-negative granules.

### **Recruitment of NRAMP1 to phagosomes in HL-60-derived granulocytes**

Localization of NRAMP1 protein to tertiary granules in primary human neutrophils suggests that NRAMP1 may be recruited to the membrane of phagosomes, after phagocytosis of microbial particles by these cells. This possibility was tested by using HL-60 cells differentiated in vitro into neutrophils following treatment with DMSO. We have previously shown that this treatment results in robust induction of *NRAMP1* mRNA<sup>24</sup> as well as other markers of the granulocytic lineage. HL-60-derived neutrophils were allowed to ingest heat-killed, opsonized *C albicans* cells for 30 minutes at 37°C. Cells were then permeabilized and analyzed by immunofluorescence for reactivity with anti-NRAMP1 antiserum (Figure 7). In intact, particle-free, differentiated HL-60 cells, NRAMP1 staining appeared intracellular and punctate, with no obvious labeling of the plasma membrane (Figure 7Ai; arrowheads). Staining was specific and absent when cells

were incubated with either normal preimmune serum (Figure 7Aii) or secondary antibody alone (Figure 7Aiii). This staining is similar to that previously observed for the mouse Nramp1 protein expressed in primary macrophages<sup>9</sup> or for the human NRAMP1 protein overexpressed in transfected CHO cells (Figure 2). In individual cells having engulfed *C albicans*, NRAMP1 staining appeared concentrated at the periphery of the internalized particles (Figure 7Ai; arrows). This staining could result from active recruitment of NRAMP1 to the phagosomal membrane or could be an optical artifact caused by displacement of unfused NRAMP1-positive vesicles by the internalized particle. To distinguish between the 2 possibilities, *C albicans* phagosomes formed in HL-60-derived neutrophils were analyzed for NRAMP1 reactivity by confocal microscopy (Figure 7Bi-ii). This analysis revealed NRAMP1 staining concentrated at the periphery of individual phagosomes, with 80% (67 of 83 scored) of phagosomes scoring positive. This finding strongly suggests active NRAMP1 recruitment at that site following fusion with tertiary granules.

## Discussion

Neutrophils are polymorphonuclear leukocytes that play a primordial role in the first line of defense against bacterial infections. Neutrophils possess a large number of bacteriostatic and bactericidal enzymes, one of the most important being the production of superoxide anions via NADPH oxidase. However, continuous production of such oxygen radicals by neutrophils can cause inflammatory reactions and is seen in autoimmune disorders.<sup>40</sup> We have previously reported very high levels of *NRAMP1* mRNA expression in human neutrophils, either in primary cells or in HL-60 cells induced to differentiate along the granulocytic pathway.<sup>24</sup> The fact that neutrophils (1) play a key role in antimicrobial defenses and in inflammatory reaction and (2) express high-level *NRAMP1* mRNA and that *NRAMP1* polymorphisms are associated with susceptibility to infections and autoimmune diseases in humans suggest that the NRAMP1 may play an important role in neutrophil function.

In the present study, we have used a rabbit antihuman NRAMP1 antibody to demonstrate robust NRAMP1 protein expression in human neutrophils. Subcellular fractionation studies indicate that NRAMP1 protein copurifies with a granule population but shows very little if any expression in the plasma membrane fraction of these cells. The NRAMP1-positive granule population is positive for the matrix marker gelatinase and is also enriched for the 39-kd  $\delta$  subunit of the V-type H<sup>+</sup>-ATPase (Figure 3). Interestingly, results in Figures 4 and 5 suggest that NRAMP1 may be more "specific" for  $\beta_2$  granules than the classic gelatinase matrix marker. At least 2 factors may have contributed to this observation: The first is the sensitivity of the immunoblotting technique used, including a possible threshold effect of the anti-NRAMP1 antiserum with no detectable signal below a certain level (as opposed to the more abundant matrix marker gelatinase). The second is that NRAMP1 may be more susceptible than gelatinase to proteolytic degradation when present in either the  $\beta_1$  or the  $\gamma$  fractions. The presence of NRAMP1 protein expression in gelatinase-positive granules is paralleled by the similar kinetics of mRNA expression of the 2 corresponding genes during neutrophil ontogeny (Figure 1). Finally,

immunoelectron microscopy analysis on cryosections of primary cells show that NRAMP1 indeed localizes to a subset of granules, where it appears to be present in their membrane, in agreement with known structural features of the protein.<sup>41</sup> For double-labeling studies, a total of 115 positive granules were scored for gelatinase (G) and/or NRAMP1 reactivity (N). Of 110 G<sup>+</sup> granules, only 14 (~13%) were G<sup>+</sup>/N<sup>+</sup>. We believe that this low percentage of doubly positive granules is an underestimate and is due at least in part to the low activity of the immunopurified antihuman NRAMP1 antiserum in electron microscopy experiments. This belief is based on the observation that all N<sup>+</sup> granules contained a single gold particle, thus the possibility of a threshold effect, with a number of N<sup>+</sup> granules possibly going undetected. By opposition, gelatinase is quite abundant in these granules, and most G<sup>+</sup> granules harbored multiple grains. Nevertheless, of the total 19 N<sup>+</sup> granules recorded, 14 (~75%) were G<sup>+</sup>/N<sup>+</sup>, whereas 5 (~25%) were G<sup>-</sup>/N<sup>+</sup>, confirming an important colocalization of the 2 markers in tertiary granules. The G<sup>-</sup>/N<sup>+</sup> granules are likely to be truly G<sup>-</sup>/N<sup>+</sup> but could also be G<sup>+</sup>/N<sup>+</sup>, with gelatinase going undetected. Despite limitations associated with detection, these results suggest possible heterogeneity in tertiary granules in general, and in N<sup>+</sup> granules in particular.

Tertiary granules can be recruited to fuse with phagosomes into which they deliver enzymes that are important for the destruction of ingested bacteria.<sup>25</sup> Their matrix is characterized by the presence of the protease gelatinase, which is related to collagenase and heparanase present in other granules of these cells. They also contain cytochrome b, which consists of the heme-containing, membrane-bound gp91-phox and p22-phox subunits that ultimately form the superoxide-producing complex NADPH oxidase. Therefore, recruitment of tertiary granules to phagosomes formed in neutrophils after ingestion of microbial pathogens would be expected to deliver the NRAMP1 protein to the membrane of such phagosomes. This proposition was verified by immunofluorescence and confocal microscopy on HL-60 cells differentiated into granulocytes and that clearly show association of NRAMP1 to *C. albicans*-containing phagosome. This situation is reminiscent to that seen in mononuclear phagocytes such as monocytes and macrophages in which the mouse Nramp1 protein localizes to Lamp-1-positive lysosomes in resting cells and can be quickly recruited to the membrane of phagosomes containing either inert particles or live bacteria.<sup>4,9,10</sup> These findings also suggest that NRAMP1 may have the



same biochemical activity and play the same functional role in neutrophils and macrophages. In macrophages, Nramp1 functions as a divalent cation transporter.<sup>11-13</sup> Our group has recently shown that Nramp1 functions as an efflux pump at the phagosomal membrane,<sup>11</sup> possibly removing from the phagosomal lumen divalent cations that are either essential to bacterial growth or essential to the activity of bacterial detoxifying enzymes.<sup>7</sup> The activity of microbially encoded superoxide dismutases may be essential for survival of bacteria ingested by neutrophils, and it is tempting to speculate that removal of the  $Mn^{2+}/Fe^{2+}$  cofactors that are essential for catalytic activity of such enzymes may be the mechanism by which NRAMP1 contributes to the antimicrobial defenses of the neutrophil.

In macrophages, divalent cation transport by Nramp1 is strictly pH dependent and can be abrogated by folimycin and bafilomycin, potent inhibitors of the vacuolar  $H^+$ /ATPase, the enzyme responsible for phagosomal acidification.<sup>11</sup> This strict requirement of acidic pH for Nramp protein transport has also been established for the mammalian Nramp2 homolog,<sup>42</sup> but it is also the hallmark of the eukaryotic and prokaryotic Nramp superfamily (reviewed by Cellier et al<sup>6</sup> and Forbes and Gros<sup>7</sup>). The acidic pH may be required for either protonation of key amino acid residues in the formation of a putative transport site, or the  $\Delta pH$  may provide a portion or the entire electrochemical gradient required to energize transport. In the present study, immunoblotting of granule populations purified from primary neutrophils indicates that the NRAMP1-positive granule population is also positive for the  $\delta$  subunit of vacuolar ATPase (Figure 4), an integral, membrane-associated subunit of the enzyme.<sup>43</sup> This finding suggests that both the pH-dependent NRAMP1 transporter and the enzyme required for the generation of  $\beta$ -pH across the phagosomal membrane (vacuolar ATPase) would be simultaneously delivered to the membrane of the phagosome on recruitment of tertiary granules. This situation would provide a convenient regulatory mechanism for activating NRAMP1 at the desired transport site.

Tertiary granules can also be recruited to fuse with the plasma membrane during degranulation. They contain a pool of membrane glycoproteins such as the fMLP receptor, the FcRIII receptor, and the C3bi receptor that are important for proper adhesion

and migration of neutrophils in tissues. Therefore, it may be expected that degranulation of neutrophils may also recruit NRAMP1 to the plasma membrane. Results in Figure 5 indeed verify that NRAMP1 disappears from the tertiary granule fraction on degranulation experimentally induced by PMA treatment. However, this result is not accompanied by appearance of NRAMP1 in the plasma membrane of these cells, which when analyzed in the same experiment remains largely negative for NRAMP1 expression. This situation is similar to the membrane-bound metalloproteinase MT6/MMP-25 that is localized primarily to the membrane of gelatinase granules.<sup>39</sup> This situation suggests that NRAMP1 may be unstable at the plasma membrane and is possibly targeted for degradation. Therefore, the activity of NRAMP1 in neutrophils may be limited to possible transport function at the phagosomal membrane on recruitment from tertiary granules.

These findings suggest a possible role of NRAMP1 in neutrophil function and provide a link with the association of NRAMP1 with susceptibility to infectious diseases and inflammatory diseases noted in genetic studies.

## **Acknowledgments**

We thank Hans Janssen for technical assistance and Nico Ong for assistance with electron microscopy.

## **Footnotes**

Submitted November 19, 2001; accepted March 4, 2002.

Supported by National Institutes of Health grant AI355237 (P.G.) and the Danish Medical Research Council (N.B.). F.C.-H. is supported by a postdoctoral fellowship from Milestone Medica Corporation. P.G. and S.G. are International Research Scholars of the Howard Hughes Medical Institute (HHMI) and Distinguished Scientists of the Canadian Institutes for Health Research.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

Reprints: Philippe Gros, Department of Biochemistry, McGill University, 3655 Sir William Osler Promenade, Rm 907, Montreal, Quebec, Canada, H3G-1Y6; e-mail: gros@med.mcgill.ca.

## References

1. Malo D, Vogan K, Vidal S, et al. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse Nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics*. 1994;23:51-61.
2. Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, et al. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med*. 1995;182:655-666.
3. Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med*. 1998;49:275-287.
4. Govoni G, Canonne-Hergaux F, Pfeifer CG, et al. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun*. 1999;67:2225-2232.
5. Govoni G, Gauthier S, Billia F, Iscove NN, Gros P. Cell-specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 1997;62:277-286.
6. Cellier MF, Bergevin I, Boyer E, Richer E. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Genet*. 2001;17:365-370.
7. Forbes JR, Gros P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*. 2001;9:397-403.
8. Vidal SM, Pinner E, Lepage P, Gauthier S, Gros P. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J Immunol*. 1996;157:3559-3568.

9. Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med.* 1997;185:717-730.
10. Searle S, Bright NA, Roach TI, et al. Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection. *J Cell Sci.* 1998;111:2855-2866.
11. Jabado N, Jankowski A, Dougaparsad S, Picard V, Grinstein S, Gros P. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J Exp Med.* 2000;192:1237-1248.
12. Goswami T, Bhattacharjee A, Babal P, et al. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *Biochem J.* 2001;354:511-519.
13. Kuhn DE, Lafuse WP, Zwilling BS. Iron transport into mycobacterium avium-containing phagosomes from an Nramp1(Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. *J Leukoc Biol.* 2001;69:43-49.
14. Abel L, Sanchez FO, Oberti J, et al. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis.* 1998;177:133-145.
15. Alcais A, Sanchez FO, Thuc NV, et al. Granulomatous reaction to intradermal injection of lepromin (Mitsuda reaction) is linked to the human NRAMP1 gene in Vietnamese leprosy sibships. *J Infect Dis.* 2000;181:302-308.
16. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med.* 1998;338:640-644.
17. Greenwood CM, Fujiwara TM, Boothroyd LJ, et al. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet.* 2000;67:405-416.

18. Esposito L, Hill NJ, Pritchard LE, et al. Genetic analysis of chromosome 2 in type 1 diabetes: analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the interleukin-1 gene cluster. IMDIAB Group. *Diabetes*. 1998;47:1797-1799.
19. Sanjeevi CB, Miller EN, Dabadghao P, et al. Polymorphism at NRAMP1 and D2S1471 loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:1397-1404.
20. Shaw MA, Clayton D, Atkinson SE, et al. Linkage of rheumatoid arthritis to the candidate gene NRAMP1 on 2q35. *J Med Genet*. 1996;33:672-677.
21. Hofmeister A, Neibergs HL, Pokorny RM, Galandiuk S. The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. *Surgery*. 1997;122:173-179.
22. Searle S, Blackwell JM. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet*. 1999;36:295-299.
23. Cellier M, Govoni G, Vidal S, et al. Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med*. 1994;180:1741-1752.
24. Cellier M, Shustik C, Dalton W, et al. Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *J Leukoc Biol*. 1997;61:96-105.
25. Smolen JE, Boxer LA. Functions of neutrophils. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps T, Seligsohn U, eds. *Williams Hematology*. New York, NY: McGraw Hill; 2001:761-784.
26. Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clin Exp Immunol*. 1995;101(suppl 1):6-9.

27. Maridonneau-Parini I, de Gunzburg J. Association of rap1 and rap2 proteins with the specific granules of human neutrophils. Translocation to the plasma membrane during cell activation. *J Biol Chem.* 1992;267:6396-6402.
28. Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol.* 1995;154:4157-4165.
29. Cowland JB, Borregaard N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J Leukoc Biol.* 1999;66:989-995.
30. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
31. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Ponka P, Gros P. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood.* 1999;93:4406-4417.
32. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
33. Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J Immunol Methods.* 1999;232:131-143.
34. Calafat J, Janssen H, Stahle-Backdahl M, Zuurbier AE, Knol EF, Egesten A. Human monocytes and neutrophils store transforming growth factor-alpha in a subpopulation of cytoplasmic granules. *Blood.* 1997;90:1255-1266.
35. Liou W, Geuze HJ, Slot JW. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol.* 1996;106:41-58.

36. Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE, James DE. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol.* 1991;113:123-135.
37. Cramer E, Pryzwansky KB, Villeval JL, Testa U, Breton-Gorius J. Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold. *Blood.* 1985;65:423-432.
38. Borregaard N, Kjeldsen L, Lollike K, Sengelov H. Ca(2+)-dependent translocation of cytosolic proteins to isolated granule subpopulations and plasma membrane from human neutrophils. *FEBS Lett.* 1992;304:195-197.
39. Kang T, Yi J, Guo A, et al. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem.* 2001;276:21960-21968.
40. Fantone JC, Ward PA. Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease. *Hum Pathol.* 1985;16:973-978.
41. Cellier M, Belouchi A, Gros P. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends Genet.* 1996;12:201-204.
42. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997;388:482-488.
43. Forgac M. Structure and properties of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *J Biol Chem.* 1999;274:12951-12954.



## Figure Legends

**Figure 1. NRAMP1 expression in mature granulocytes from peripheral blood (PMN leukocytes) and 3 populations of neutrophil precursors from BM.** Total RNA was extracted from (1) band 1 cells, band cells/segmented cells; (2) band 2 cells, myelocytes/metamyelocytes; and (3) band 3 cells, myeloblasts/promyelocytes and from PMN leukocytes. After separation by electrophoresis in denaturing formaldehyde gels (10 µg/lane), RNA was blotted to a hybridization membrane. The blot was probed with cDNA probes corresponding to *NRAMP1* gene (A) and *GAPDH* gene (B) as a positive control.

**Figure 2. Detection of the NRAMP1 c-Myc-tagged proteins in CHO and U937 cells.** (A) Western blot analysis with crude membrane extracts from untransfected CHO and U937 cells and from CHO-NRAMP1 and U937-NRAMP1 transfectants was separated by SDS-PAGE on a 10% acrylamide gel followed by transfer to PVDF membranes. Immunodetection was with affinity-purified anti-NRAMP1 (i-ii) or with anti-c-Myc (iii) antibodies. The positions and sizes (in kilodaltons) of molecular weight markers are shown. (B) Untransfected CHO cells (i,iii) and CHO-NRAMP1 (ii,iv) were processed for immunocytochemistry (i-ii) or immunofluorescence (iii-iv) with our affinity-purified anti-NRAMP1 antibody. Arrows indicate some NRAMP1-positive cells.

**Figure 3. Subcellular fractionation of nitrogen-cavitated neutrophils on 3-layer Percoll gradient.** After nitrogen cavitation, 10 mL postnuclear supernatant was applied on top of a 3-layer Percoll gradient. After centrifugation, the gradients were fractionated by aspiration from the bottom of the tube in 1-mL fractions. Fractions 1 to 6, 7 to 12, 13 to 18, and 19 to 24 were pooled in 4 distinct populations named 1, 2, 3, and 4, respectively. These pooled fractions were assayed for myeloperoxidase (A,E), lactoferrin (B,F), gelatinase (C,G), and albumin (D,H) by immunologic assays (ELISA; A-D) and by immunoblotting (E-H). In both markers assay, the pooled fractions 1, 2, 3, and 4 were identified as  $\alpha$ -,  $\beta$ <sub>1</sub>-,  $\beta$ <sub>2</sub>-, and  $\gamma$ -band, respectively. In E to H, the

positions and sizes of the molecular weight markers are shown.

**Figure 4. Detection of NRAMP1 in human neutrophils granules by Western blotting.**

An immunoblot of purified fractions (lane 1,  $\alpha$ ; lane 2,  $\beta_1$ ; lane 3,  $\beta_2$ ; and lane 4,  $\gamma$ ; 25  $\mu$ g of each fraction per lane) was probed with an antibody against NRAMP1 (NT) (A). After stripping, the membrane was reprobed with an antibody against the 39-kd subunit of the VATPase (B). As a positive control for the anti-NRAMP1 antibody, 5 $\mu$ g membrane proteins from U937 transfectants expressing the c-Myc-tagged NRAMP1 was included (lane 5). The positions and sizes (in kilodaltons) of the molecular weight markers are shown.

**Figure 5. Expression of NRAMP1 in human neutrophils granules after PMA treatment.**

Prior to disruption, cells were either kept on ice (control; lane -) or stimulated for 15 minutes at 37°C with 2 $\mu$ g/mL PMA (lane +). After washing and disruption of the cells, the postnuclear supernatants were centrifuged on a 3-layer Percoll gradients, fractionated, and pooled in 4 samples 1, 2, 3, and 4, as described in Figure 3. Pooled fractions 1, 2, 3, and 4 were assayed by ELISA for myeloperoxidase, lactoferrin, albumin (not shown), and gelatinase (A) and identified as  $\alpha$ -,  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -, and  $\gamma$ -bands. The same fractions (25  $\mu$ g) were separated by SDS-PAGE on a 10% acrylamide gel followed by transfer to PVDF membrane (B,C). Immunoblotting was performed with antibodies raised against gelatinase (B) and NRAMP1 (C). The positions and sizes (in kilodaltons) of the molecular weight markers are shown.

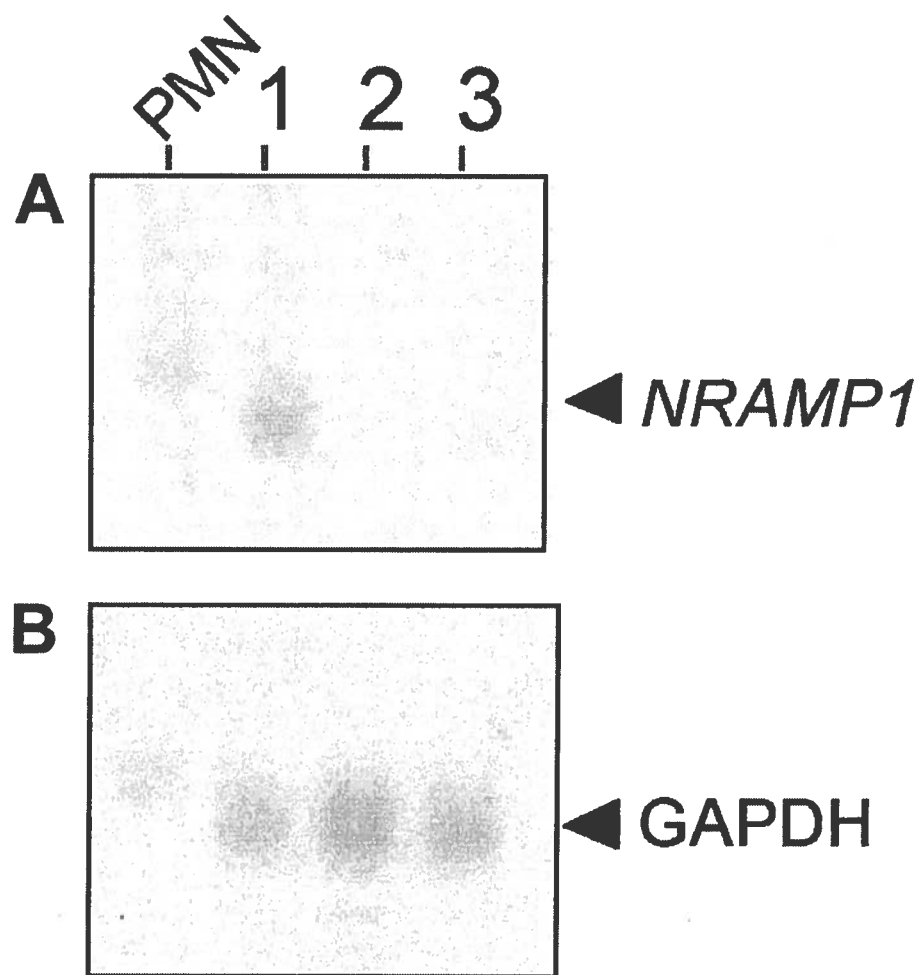
**Figure 6. Detection of NRAMP1 and gelatinase in human neutrophils granules by immunoelectron microscopy.**

PMN leukocytes were fixed, cryosectioned, and labeled with anti-NRAMP1 and protein A-gold (10 nm; A) or double-labeled with antigelatinase and protein A-gold (10 nm) followed by labeling with anti-NRAMP1 and protein A-gold (15 nm; B). (A) Labeling on the membranes of some granules (arrows) is shown. (B) A population of granules is highly labeled for gelatinase on the matrix (small arrows), and labeling for NRAMP1 (large arrows) is shown on the membrane of some granules containing gelatinase and some negative for gelatinase. Bar = 200 nm.

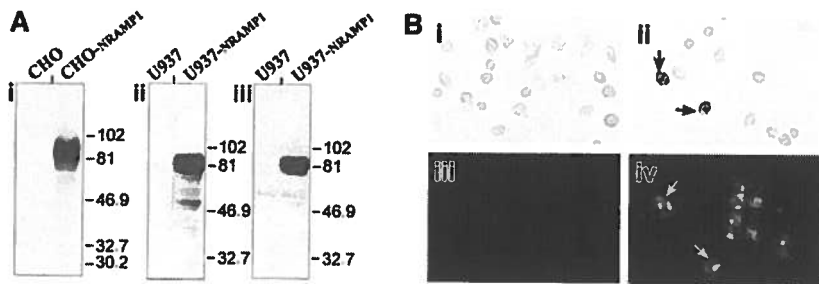
**Figure 7. NRAMP1 association with *C albicans*-containing phagosomes in HL-60 cells differentiated into granulocytes.** After treatment for 5 days with DMSO, HL-60 cells were allowed to ingest heat-killed *C albicans* for 30 minutes at 37°C. The cells were then washed free of uningested particles, fixed, and permeabilized before indirect immunofluorescence examined by using a Nikon optical fluorescence microscope (A) or a confocal microscope (B). Detection was performed with an affinity-purified rabbit anti-NRAMP1 antibody (Ai, Bi, and Bii), nonimmune serum (Aii), or no primary antibody (Aiii) on the cells. Immunofluorescence micrographs (Ai-Aiii) and the corresponding bright field images (Aiv-Avi) are shown. Arrowhead shows an intact, particle-free, differentiated HL-60 cell. Arrows point to ingested *C albicans*.

**Figures**

**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

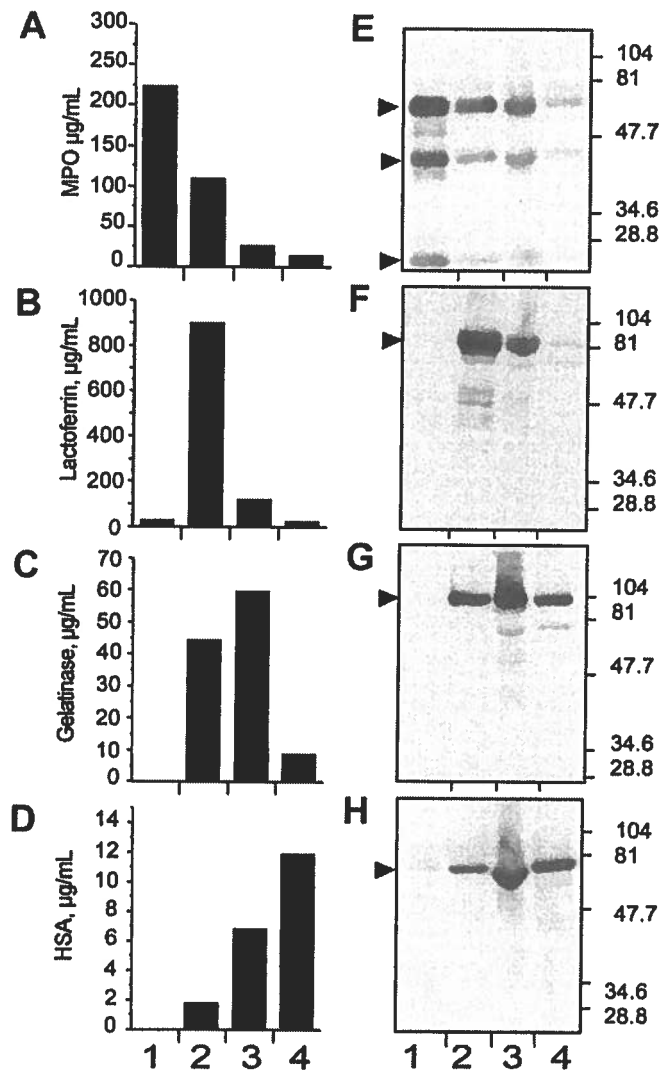


Figure 4

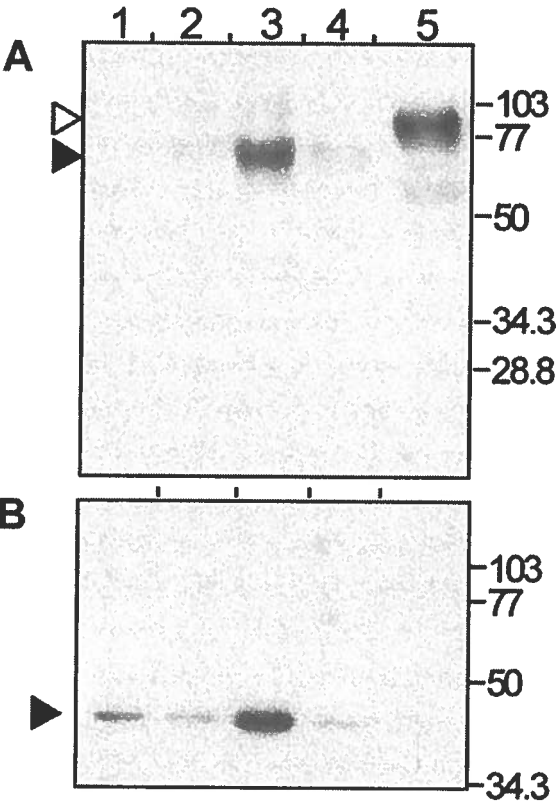
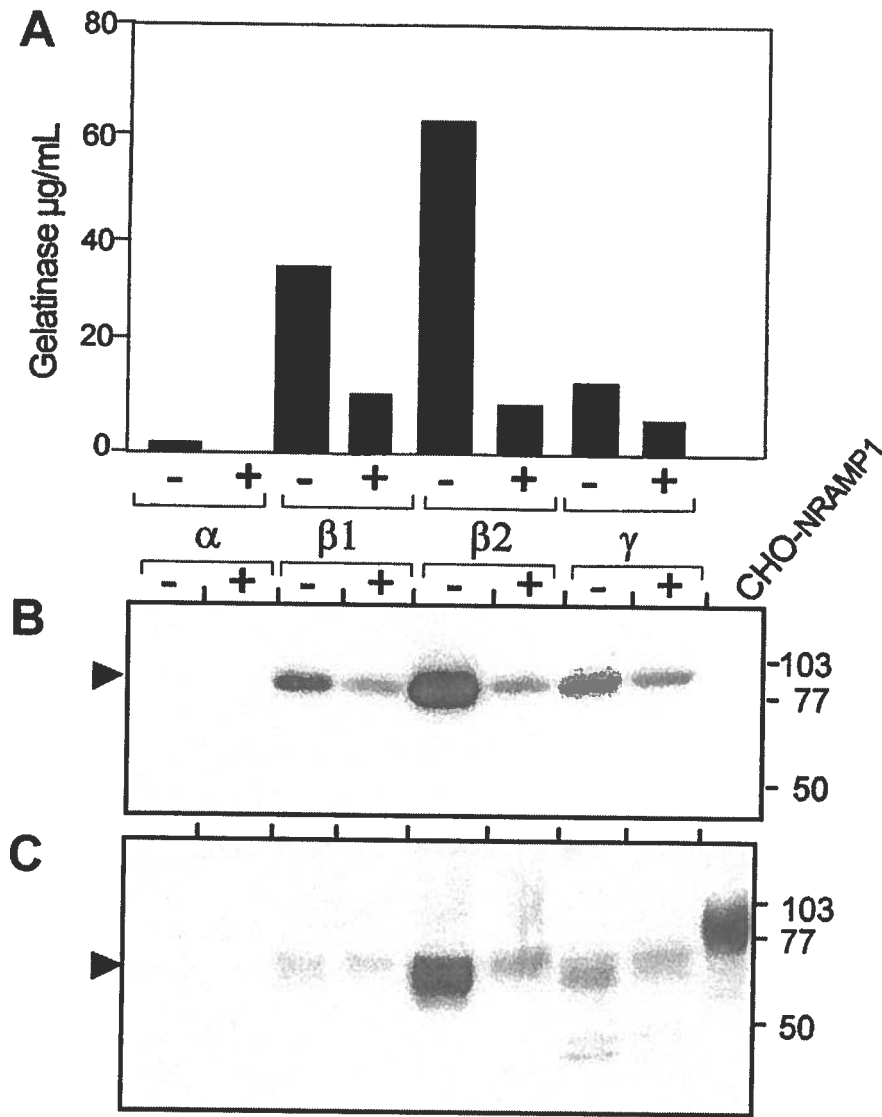
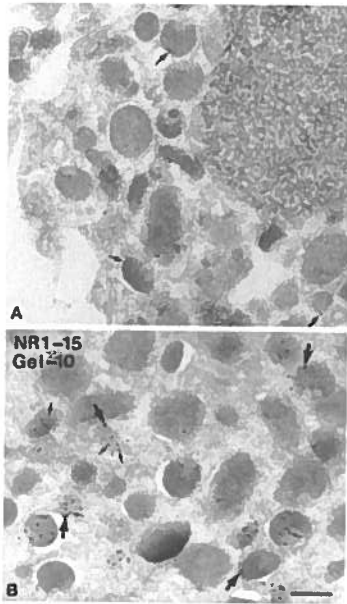


Figure 5

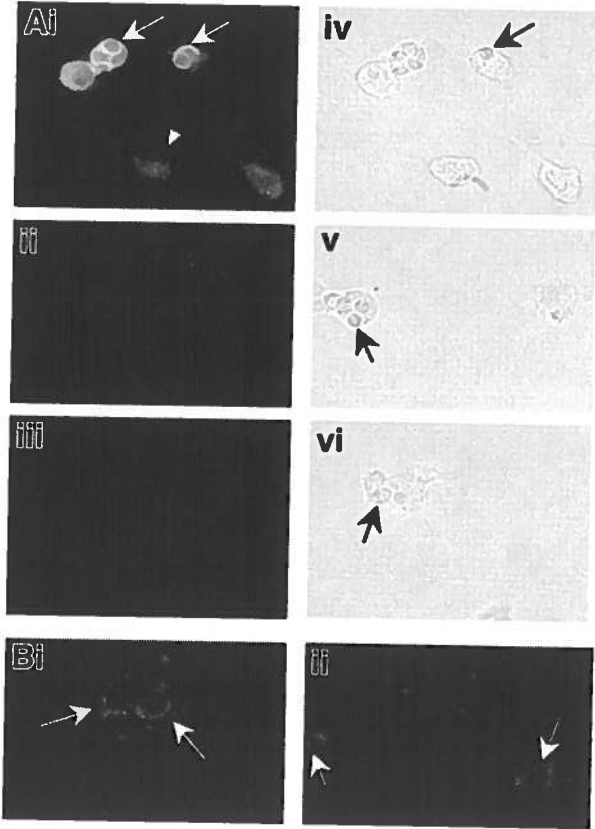


**Figure 6**





**Figure 7**



## Chapitre 4 : Troisième article

Sp1 and C/EBP factors regulate *NRAMP1* gene expression

### *Mise en contexte du troisième article*

Les travaux effectués pour ce troisième article découlent de l'identification de la région conférant la spécificité myéloïde identifiée dans le premier article (Roig *et al.* 2002). Cette courte région permet d'activer la transcription durant la différenciation induite par la VD de la lignée cellulaire HL-60, mais non lors de la stimulation de la lignée lymphoïde Jurkat. La région identifiée englobe le polymorphisme fonctionnel précédemment décrit (Searle et Blackwell 1999) qui est associé à la susceptibilité aux infections mycobactériennes (Abel *et al.* 1998; Bellamy *et al.* 1998). Les objectifs initiaux étaient donc de définir les éléments agissant *en cis* et *en trans* qui confèrent la réponse à la VD dans un contexte myéloïde. Ceci permettrait à terme de définir la régulation myéloïde du promoteur de *NRAMP1*, régulation qui est une différence fonctionnelle importante vis-à-vis son homologue *NRAMP2*.

Pour ce troisième article j'ai planifié et effectué les manipulations présentées dans les figures 1 à 3. Pour les travaux présentés à la figure 4 j'ai effectué les travaux assisté de Carole Champion. Plus précisément j'ai mis en place les co-transfections (recherche, demande et préparation des plasmides, optimisation des conditions) et produit l'essentiel des données (mis à part les co-transfections VDR et VDR-Sp1). J'ai également produit la figure 5 A et la majorité de la figure 5B ; dont l'empreinte à la Dnase permettant d'identifier la région E14, le design des oligonucléotides, déterminer l'importance du site E14M2, la production des extraits nucléaires

Finalement, j'ai initié l'analyse *in vivo* dans la lignée HL-60 de l'effet du facteur Sp1 (fig XXX) (design des oligo, optimisation des conditions, planification de l'expérience) qui a été poursuivie par Carole sous ma supervision après mon départ du laboratoire.

L'article est présentement en processus de soumission au journal « Molecular and Cellular Biology »

***Sp1 and C/EBP factors regulate NRAMP1 gene expression***

**Richer Etienne<sup>1</sup>, Carole Champion, Mathieu F.M. Cellier\***

INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul des Prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

<sup>1</sup> present address : McGill University, Centre for the Study of Host Resistance, 1650 ave Cedar, Montreal, QC, Canada, H3G 1A4

\* corresponding author: Mathieu Cellier, Ph. D, INRS-Institut Armand-Frappier, 531, Bd des prairies, Laval, QC, Canada, H7V 1B7

Tel (450) 687-5010 x4681; Fax (450) 686-5301; mathieu.cellier@iaf.inrs.ca

Word counts:

Introduction, Results, Discussion: 868, 2590, 1 730 = 5 188

Materials and Methods: 2 159

Running title: transcriptional activation of *NRAMP1* in myeloid cells

Abbreviations used in this paper: VD,  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ ,  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ; KH, KH 1060, *20-epi-22-oxa-24a,26a,27a-tri-homo-1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>*.

## Abstract

The Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP1) belongs to a conserved family of membrane metal transporters. *NRAMP1* is expressed in mature phagocytes and polymorphism may contribute to predispose to infectious and inflammatory diseases. To characterize the transcriptional mechanisms controlling *NRAMP1* expression, we previously showed that a 263bp region upstream of *NRAMP1* ATG drives basal promoter activity, and a 325bp further upstream region confers myeloid specificity and activation during differentiation of HL-60 cells. Herein, the major transcription start site was mapped in the basal region by S1 protection assay. Three *cis* acting elements essential for myeloid transactivation were identified by *in vitro* DNase footprinting and EMSA, and *in vivo* stable transfection using linker-mutated constructs. One *cis* element binds directly Sp1, shown by competitive EMSA and supershift experiments; it is required for *NRAMP1* promoter transactivation by Sp1 when cotransfected in 293T cells, as opposed to the basal region. A site critical for basal expression was also defined, which binds C/EBPs proteins *in vitro* and is crucial for *NRAMP1* transcription, including when co-transfected with Sp1 or C/EBP factors. Additive effects observed in co-transfections with Sp1 and C/EBPs, providing *NRAMP1* full-length promoter, indicate these factors interact at distance to control *NRAMP1* myeloid expression.

Word count: 199

## Introduction

The natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) was identified by positional cloning using inbred strains of laboratory mice innately sensitive to intracellular parasites (81). In absence of Nramp1 protein in the membrane of phagosomes, ingested microbes grow more easily and can eventually produce a lethal infection (82). Human *NRAMP1* polymorphisms were linked to innate sensitivity to tuberculosis, showing mendelian inheritance of *NRAMP1* genotype segregating with TB susceptibility phenotype (23). Case-control studies indicated a role of *NRAMP1* gene in host resistance, depending on ethnic background, and suggested that polymorphisms in the vitamin-D receptor (VDR) gene may be associated with human susceptibility to mycobacterial infections (14).

*NRAMP1* promoter alleles were associated with increased risk of human diseases suggesting a possible impact on NRAMP1 expression and function (1, 5, 6, 17, 18, 25, 45, 74). A (CA) repeat with nine alleles (1-9, 36, 73, 85) was proposed to adopt a left-handed Z-DNA conformation, contributing to *NRAMP1* genetic variation and expression level (66, 73). Transient transfection experiments in U937 and THP1 cells showed that allele 3, which is one the most common with allele 2, drove the highest expression level of a reporter gene after stimulation with bacterial lipopoly-saccharide (LPS) (73). This effect was dependent on another polymorphism located downstream, the single nucleotide polymorphism (-237T/C) (85).

*NRAMP1* gene expression is tightly restricted to mature myeloid cells: monocytes, macrophages and neutrophils, ranked by increasing mRNA abundance (12). The human leukemia cell line HL-60 is a useful model to study *NRAMP1* transcription during myeloid differentiation, using either dimethyl sulfoxide (DMSO, but not retinoic acid) to produce granulocytes or  $1\alpha, 25$  (OH)<sub>2</sub>-Vitamin D3 (VitD) to generate monocyte/macrophage, which further up-regulate *NRAMP1* expression in response to IFN- $\gamma$  (67). After phagocytosis of *C. albicans* by differentiated HL-60 cells, NRAMP1 protein becomes associated with the phagosomal membrane (67) where it can contribute

to deplete the phagosomal lumen of vital nutrients such as iron and manganese to limit microbe survival. This intracellular contribution to host defence would be complementary to those of lactoferrin (LF) (83) and lipocalin 2 (19) which are secreted in response to infection to sequester, and prevent microbial use of, extracellular iron.

A better knowledge of the molecular determinants controlling *NRAMP1* specific expression will shed light on the *cis* acting elements and *trans* factors involved, which enable its regulation during myelopoiesis and immune response, and further increase the understanding of the possible role of *NRAMP1* promoter genetic polymorphisms in human susceptibility to diseases, including infectious diseases due to intracellular parasites.

VitD genomic agonists have profound effects on the immune system, stimulating phagocytes antimicrobial defences and macrophage maturation (52). Among several major transcription factors known to act in concert to regulate myelopoiesis (20, 69), some were identified playing key roles in the regulation of genes expressed during VitD-induced differentiation, including VDR (41), Sp1 (26), RB (27) and C/EBPs (27).

Sp1 regulates the expression of several genes associated with innate immunity by acting cooperatively as/in a module, with other tissue- or 'terminal differentiation'-specific nuclear factors (65). Sp1 is often associated with Ets-related transcription factors to activate genes, for instance, GABP to activate *CD18* promoter (68), PU.1 in the case of the neutrophil elastase gene (55), MEF for the transcription of the  $\beta$ -defensin (76) and lysosyme (29) genes. Concerning PU.1, which is essential for myelopoiesis, it was shown to induce chromosomal conformational changes facilitating Sp1 binding, a cooperative effect that was correlated to modest decrease in myeloid gene expression after mutation of the promoter Sp1 site (86).

Members of the C/EBP family are prominent nuclear factors that cooperate with Sp1 to regulate myeloid genes. C/EBP isoforms display specific and lineage-restricted regulatory effects by interacting with other factors, and through the regulation of their expression (20). C/EBP factors have prominent roles in hematopoiesis, shown by reprogramming B

lymphocytes into macrophages by overexpression of C/EBP $\alpha$  and  $\beta$  (84); C/EBP $\alpha$  is required for neutrophil development, and overexpression of C/EBP $\alpha$  in the histiocytic-like cell line U937 suffices to induce a neutrophilic phenotype (62). C/EBP $\alpha$  and  $\beta$  are also differentially affected during monocytic differentiation of HL-60 cells; C/EBP $\alpha$  activity is down-regulated by phosphorylation (70) and C/EBP  $\beta$  is activated by Ras- and MAPk-dependent kinase (48); C/EBP $\beta$  is also essential for VitD-induced differentiation (27) and stimulates the 25-hydroxyvitamin D(3) 24-hydrolase (16). C/EBP $\epsilon$  is expressed later than C/EBP $\alpha$  in granulocytes and it is required for the expression of the components of the secondary granules of neutrophils(21).

Two *cis* active regions of *NRAMP1* promoter were distinguished in response to VitD genomic agonists (67). A proximal region starting 262 bp upstream of *NRAMP1* ATG is sufficient for maximal transcriptional activity in non myeloid cell lines Jurkat and 293T (67). A more distal region (588 to 262 bp upstream *NRAMP1* ATG) confers maximal *NRAMP1* promoter activity and responsiveness to VitD in HL-60, but not Jurkat T cells (67). The data suggest that *NRAMP1* promoter comprises a proximal non specific *cis* active region that may bind a basal transcription complex (core promoter) and a more distal myeloid responsive region (upstream promoter). To verify that hypothesis we set to identify *NRAMP1* transcriptional start site in HL-60 cells differentiated toward macrophages with VitD genomic agonists, to locate myeloid-specific *cis* acting sites and to identify possible transcription factors that control *NRAMP1* myeloid expression.

## **Materials & Methods**

### **Oligonucleotide labeling**

To anneal single stranded oligonucleotides, 200 pmol of each oligonucleotide was incubated in 0.1X NEB2 buffer (New England Biolabs, NEB, Mississauga ON) in a volume of 20  $\mu$ L at 95°C for 2 minutes then cooled down at room temperature for 1h.; final volume was completed to 100 $\mu$ L. 8 pmol of annealed oligonucleotide was labelled for 2 h at 37°C with 15 units of T4 Polynucleotide kinase (NEB) in the presence of 15  $\mu$ Ci of  $\gamma^{32}$ P ATP (Amersham, Baie d'Urfé, QC). The probes were purified using the Quiaquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Mississauga ON) and eluted in 80  $\mu$ L of buffer EB supplied with the kit.

### **Sequencing reaction**

Sequencing reactions were performed with the Sequanase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB, Baie d'Urfé QC) according to the manufacturer protocol using the primers designed to amplify the footprinting probes (F1F, F1R, F2F, F2R, Table 1).

### **Nuclear protein extraction**

Cells were stimulated either for 4 days with  $10^{-8}$ M KH1060 (KH), fresh medium being added on day 3, and 1 additional day with IFN $\gamma$  100U/mL (KH-IFN $\gamma$ ), or for 6 days with 1.25% DMSO, or left untreated (ND) in a minimum culture volume of 20mL. Nuclear extract were prepared with the Nu-Clear extraction kit (Sigma, Oakville ON) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells (usually  $10^7$ ) were washed twice in cold PBS before resuspension in hypotonic lysis buffer with protease inhibitors and DTT in a final volume of 500 $\mu$ L, equivalent to five packed cell volume. Cells were allowed to swell on ice for 15 minutes before lysis with a final concentration of 0.6% Igepal CA-630 (nonionic, non-denaturing detergent) with agitation for 30sec. Lysates were centrifuged for 30 sec at 12 000 g and 2/3 packed cell volume of extraction buffer containing protease inhibitor and DTT was added to the nuclei pellet and the protein were extracted with



agitation at 4°C for 20 minutes. After 5 minute 20 000 g centrifugation at 4°C the supernatant was collected into a new tube. Protein concentration was determined with a Non-Interfering Protein Assay Kit (CalBiochem, San Diego CA) and adjusted to 2µg/mL with the dilution buffer.

### **Dnase Footprinting**

Probes were prepared by PCR amplification of the pGL3NR1L plasmid with *Pfu* polymerase (Gibco, Burlington ON) and the primers listed in Table 1 (F1F, F1R, F2F, F2R). Amplification cycle was 95°C for 45s, 26 cycles (95°C for 45s, 56°C for 60s, 72°C for 120s), 72°C for 10min, ending at 4°C. PCR products were purified with the Qiaquick purification column (Qiagen). Purified PCR products were labeled with  $\gamma^{32}\text{P}$  and Poly Nucleotide Kinase (NEB) after restriction enzyme digestion at one end to produce single stranded probes (F1F, *Dra* III; F1R, *Xho* I; F2F, *Hinf* 1; F2R, *BsaA* 1 (NEB). DNase footprinting was performed using the Core Footprinting System (Promega, Madison WI) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 5µL of RQ1 RNase-Free DNase (1U/µL) was diluted in 100 mL of Tris-HCL (pH 8.0) on ice. For each reaction, 2µL of nuclear extract at 2µg/µL in binding buffer with  $\text{Ca}^{2+}$  / $\text{Mg}^{2+}$  were mixed with 3uL of the solution of diluted DNase and incubated at room temperature for 1 minute before addition of the Stop Solution. DNA was extracted from each reaction by phenol:chloroform:isoamyl alcohol, precipitated with ethanol and resuspended in Loading solution. Samples were loaded on 6% urea denaturing polyacrylamide sequencing gel and runned at 1600V, 50W in TBE 1X buffer for 2h and revealed by autoradiography or using a PhosphorImager cassette (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC).

### **Gel Shift**

Binding reactions were conducted as previously described (57). 2 µg of nuclear extract was incubated on ice for 5 minutes on ice with 1.5µg PolyIC (Amersham), 1.125 µg BSA in a total volume of 15µL and an excess of 5 fold to 50 fold unlabelled oligonucleotide, as indicated. 0.1 pmol of the radioactive probe was added and the mix incubated on ice for 2

h. For supershift experiment, anti-Sp1 antibody (sc-420 X, Santa-Cruz, Santa Cruz, CA) was added to the mix for an additional 30 min on ice (0.5µg to 2µg or 4µg for super-shift assays using E10 or E6, respectively; 0.5uL to 2.5uL of anti mouse IgG Goat serum (cat #CL1200 Cedarlane, Hornby ON) were used as controls). Samples were loaded on 6% polyacrylamide gel (240V, 0.5X TBE) and exposed wet in a PhosphorImager cassette (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC) at -80°C for 16-70 hours. Consensus binding sites for transcription factors known to be active in myeloid cells, and for which potential binding sites were identified by *in silico* analysis of *NRAMP1* promoter sequence using AliBaba 2.1 (22) and MATCH 1.0 (31) softwares (both accessed on the BioBase web site at <http://www.biobase.de/>), were used as decoys in competitive inhibition of nuclear extracts binding to *NRAMP1* promoter, together with their corresponding inactive mutated sites as negative controls. The sense strand of the dsODN used in this study are indicated: wild type MEF decoy 5'- AAG AAG GAA GTG AAA AGA TG-3' and mutated MEF decoy 5'- AAG AAG Gtc GTG AAA AGA TG-3' (29); wild type Sp1 decoy 5'-ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C-3' and mutated Sp1 decoy 5'-ATT CGA TCG GGA TGG GGC GAG C-3' (37); wild type AP-1 decoy 5'- CGC TTG ATG ACT CAG CCG GAA -3' and mutated AP-1 decoy 5'- CGC TTG ATG ACT tgG CCG GAA -3' (Santa Cruz); wild type STAT1 decoy 5'- CAT GTT ATG CAT ATT CCT GTA AGT -3' and mutated STAT1 decoy 5'- CAT GTT ATG CAT ATT gga GTA AGT -3'; wild type IRF-1 decoy 5'- GGA AGC GAA AAT GAA ATT GAC T -3' and mutated IRF-1 decoy 5'- GGA AGC GAg gAT GAg gTT GAC T -3' (SantaCruz); wild type GAS/ISRE decoy 5'- AAG TAC TTT CAG TTT CAT ATT ACT CTA -3' and mutated GAS/ISRE decoy 5'- AAG TAC TTT CAG Tgg tcT ATT ACT CTA -3' (SantaCruz); wild type PU.1/IRF decoy 5'- CTT TGA GGA ACT GAA AAC AGA ACC T-3', mutated PU.1 wild type IRF decoy 5'- CTT TGA ttc aCT GAA AAC AGA ACC T-3' and wild-type PU.1 mutated IRF-1 decoy 5'- CTT TGA GGA ACT GAt cAC AGA ACC T-3' (46). Wild type PU.1 ODN decoy 5'-GCT CAA AGA AGG GCA GAA AAG GAG AAG TAG G-3' and its mutated version 5'-GCT CAA AGA AGG GCA Gcc cgG GAG AAG TAG G-3' are derived from the CD11b promoter PU.1 binding site (57). The sequence of the wild type CEBP decoy and mutated version 5'- TGC AGA TTG CGC AAT CTG CA -3' and 5'- TGC AGA gac tag tcT CTG CA -3', respectively were previously described (60) as were the wild type CDP decoy and mutated version, 5'- AAA AGA AGC TTA

TCG ATA CCG T -3' and 5'- AAA AGA AGC TTA Ttc ATA CCG T -3', respectively (51).

### **S1 nuclease analysis**

A 70-mer probe comprising a synthetic 7-mer at its 5' end was labeled in 3' using the T4 Polynucleotide kinase (NEB) and purified as described (71) by excision of the upper band from a 12% polyacrylamide/urea gel after autoradiographic exposure « SuperECL » (Amersham). The probe was eluted overnight at 37°C with agitation in 1 mL of elution buffer, which was reduced to 100µL with 1-butanol (Fisher, Ottawa ON) and ethanol precipitated. 90000 cpm of the probe (NR1S1, depicted in Fig. 6) were co precipitated with 30 µg of total RNA from VitD-treated HL-60 cells and resuspended in 10 µL of hybridization buffer (11), heated at 90°C for 5 min then incubated for 16h at 60°C. 190µL of S1 buffer containing 20 units of nuclease was added to the hybridize mix and incubated 1h at 37°C. The fragments protected from digestion by hybridization to the target mRNA ends were extracted with 300µL of phenol/chloroform, precipitated, resuspended in 6 µL of loading buffer (Promega Core Footprinting Kit), loaded on a 8% sequencing gel, run at 1400V 40W for 2h fixed for 30min (15% MeOH, 5% glacial acetic acid) and dried at 80°C for 1h. The gel was exposed for 7 days in a Phosphor Imager Screen.

### **Promoter constructs**

The allele 3 reporter constructs pGL3NR1S, pGL3NR1M, pGL3NR1L and SrL were previously described (67). To construct pGL3NR1M-1 and pGL3NR1M-2, pGL3NR1L was partly digested with either the restriction endonuclease *BsaA* 1 or *Dra* III, respectively, and then digested completely with *Sma* I. The resulting 5201pb and 5087pb digestion products were each gel purified with Qiaquick column (Qiagen) and self-ligated with DNA ligase (NEB). Clones were selected for the loss of the *Pst*I site. pGL35E3 and pGL35E4 were produced by PCR amplification of the pGL3NR1L plasmid with *Pfu*

polymerase (Stratagene, La Jolla CA ) and the oligonucleotide primers 5E4 or 5E3 and LucIR (Table 1), by cycling 95°C for 45s, 4 cycles (95°C for 45s, 54°C for 60s, 72°C for 120s), 22 cycles (95°C for 45s, 58°C for 60s, 72°C for 120s), 72°C for 10min, 4°C. PCR products were gel purified and digested with *Xho* I and *Nar* I and ligated to pGL3NR1L (*Xho* I-*Nar* I). The DNA sequence of selected clones was determined.

Mutagenesis of the pGL3NR1L plasmid was produced by overlap PCR (24). EMSA oligonucleotides pairs for the E2M2, E6M2 and E10M0 sites were used in combination with RVP3 and LucIR to produce two PCR fragments for each region. PCR was done with *Pfu* polymerase (Stratagene), 95°C for 45s, 4 cycles (95°C for 45s, 48°C for 60s, 72°C for 120s), 22 cycles (95°C for 45s, 54°C for 60s, 72°C for 120s), 72°C for 10min, 4°C. PCR products (145 and 651 pb, E2M2; 299 and 497 pb, E6M2 and 429 and 367 pb, E10M0) were gel purified with Qiaquick column (Qiagen). Equimolar amount of corresponding PCR products were mixed to produce mutagenised promoter fragment by PCR amplification using the primers LucIR and RVP3 and 95°C for 45s, 4 cycles (95°C for 45s, 48°C for 60s, 72°C for 120s), 22 cycles (95°C for 45s, 54°C for 60s, 72°C for 120s), 72°C for 10min, 4°C. The PCR products were gel purified, treated with the restriction endonucleases *Nhe* I and *Nar*I (NEB) and purified with Nucleotide removal kit (Qiagen) before ligation with the pGL3NR1L vector treated with the same restriction enzymes. The sequence of all constructions was determined prior to subcloning in the integrative vector SrL. SrL plasmid was digested with *Bam*H I and *Kpn* I. The 4191 pb digestion product was gel purified, treated with calf intestinal phosphatase (NEB) and ligated to inserts prepared using the same enzymes. The length of the inserted promoter constructs was verified by genomic DNA analysis of the clones obtained by PCR amplification using the primers RVP3 and LucIR 30 cycles (95°C for 45s, 54°C for 60s, 72°C for 120s).

## **Transfections**

Stable transfections of the HL-60 cell line were done as previously described (67). 293T cells were transiently transfected using GenePORTER reagent (GeneTherapy system, San

Diego, CA) according to the manufacturer protocol. Cells were seeded in 96-well plates the day prior transfection at 25% confluence. The transfection volume used was 100  $\mu$ L, using 1.5  $\mu$ L of GenePORTER with a total of 400 ng DNA: 50 ng pRLTK control plasmid, 150 ng reporter plasmid and a total of 200 ng of transcription factor expression plasmid and/or pBluescriptKS+ plasmid as a control or to maintain the total DNA quantity constant. The expression plasmids encoding the following transcription factors were kindly provided by Robert Tjian, *Sp1*, (University of California, Berkeley) (13) and Guntram Suske, *Sp3*, (Institute of Molecular Biology and Tumor Research, Marburg, Germany) (15), Carlos Ciudad, *NF- $\kappa$ B*, (University of Barcelona) (50), Thi-Minh Nguyen, *VDR*, CNRS/UMR 8104, Hôpital St Vincent de Paul, 75014, Paris, France (49), Alain Nepveu, *CDP* and *CDP<sub>878-1505</sub>*, (Royal Victoria Hospital, Montreal, Canada) (78), Timothy Bigby, *C/EBP $\alpha$* ,  *$\beta$*  and  *$\epsilon$*  (University of California, San Diego) (64), and John Hiscott, *Pu.1*, *IRF4* and *IRF8*, (Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Canada) (4). The GenePORTER-DNA mixture was left at room temperature for 40 minutes, added to the cells at 37°C for 5 hours and an equal volume of RPMI 20% FCS was then added overnight. Cells were lysed with Reporter Lysis Buffer (Promega) and luciferase activity assayed with the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) according to the manufacturer.

#### **Antisense inhibition of Vit D induced *NRAMP1* transcription in HL-60 cells**

Antisense inhibition of Sp1 expression has been previously shown to reduce integrin expression in HL-60 cells (54). The same phosphorothioate antisense ODNs were used in this study, and the sequence of the sense strand indicated: anti-Sp1 Thr83 5'- GTG GCT GTG AGG TCA AGC TCA CCT GT -3' and anti-Sp1 Pro 158 5'- GGA CCT CAC TAC GGA TTA TA -3'. A scrambled anti-Sp1 5'- ATT GCA TCT ATC GGC TTG ATT TAC CT -3' and an anti-Sp3 5'- AAG TAG CAG CAC TTG GAA TCT GGA CT -3' phosphorothioate ODNs were used as controls (54). Antisense ODNs (2  $\mu$ M) were added to cells (HL-60 stable transfectant HSRL5) either untreated or previously differentiated for 3 days with KH, and the resulting NR1-Luc (NR1L) expression levels were measured after 24h incubation..



## Results:

### **Delineating *NRAMP1* cis acting elements in HL-60 cells in response to VitD**

Previous studies employed primer extension to map *NRAMP1* transcriptional start site and found different results in different cells (7, 35). To identify *NRAMP1* transcription start site in HL-60 cells an S1 protection assay was used (Fig. 1A). Two major fragments were found protected, which lacked 10 and 38 bases compared to the specific probe end, the latter being more abundant (hereafter denominated -28 and +1, respectively). Both fragments displayed length heterogeneity. No fragment length corresponding to digestion of the synthetic 5' 7-mer only, indicated the absence of additional start sites upstream of the designed probe. The length of the fragments obtained confirms previous data and further shows heterogeneity in the transcription start site in a single cell population. The results imply that *NRAMP1* promoter fragment NR1S can bind a basal transcription complex around the +1 and -28 sites, and support the view that *cis* acting elements located upstream of fragment NR1S mediate myeloid specific control of *NRAMP1* gene expression. To locate these myeloid specific *cis* elements a set of nested deletions SrL, 5E3, 5E4, M-1, M-2 was generated to produce stable transfectants in HL-60 cells which were tested for VitD-induced *NRAMP1* gene expression (relative luciferase activity, Fig. 1B). Although the deletion 5E3 retained some activity, minimal expression was observed with further deletions, while fragment S also retained some activity. Similar data were obtained in response to DMSO (Fig. 3B), implying that the region between NR1L and 5E4 ends is required for myeloid expression of *NRAMP1*.

### **Strategy to identify *NRAMP1* myeloid specific cis acting elements**

To identify binding sites potentially responsible for myeloid specific expression of *NRAMP1* gene, promoter fragments overlapping the upstream region were used as probes for *in vitro* DNase footprint experiments conducted on both strands. Up to fourteen regions showing protection were identified (E1-E14). No clear difference was observed in

the protection pattern obtained with nuclear extracts from HL-60 cells undifferentiated or differentiated with VitD or DMSO although some alterations were seen with Jurkat nuclear extracts. Double stranded oligonucleotides (dsODN, 30bp) overlapping the protected areas were synthesized and used in EMSA to assess transcription factors binding activity *in vitro*. Band-shift competition with excess unlabeled dsODN was used to evaluate the nuclear factors binding specificity.

To better characterize the candidate *NRAMP1 cis* acting elements, additional dsODN were synthesized . Consensus binding sites for known transcription factors were used as decoys to study competitive inhibition of nuclear extracts binding to *NRAMP1* promoter. *NRAMP1* linker mutations were designed to delineate the specific *cis* acting elements *in vitro* and *in vivo* using electrophoretic mobility shift and stable transfection assays, respectively. This strategy revealed three *cis* elements, which were found active *in vivo*, and are described in details below. One of them constitutes a prominent binding site for Sp1.

#### ***NRAMP1* promoter *cis*-site E10 binds Sp1 *in vitro***

E10 site was identified as a cytosine-rich footprint which was rather faint in the *in vitro* conditions that were used (Fig. 2A, left). This protected site is located between the boundaries of fragments M-2 and S (Fig. 2B) and no difference was observed in intensity or quality between nuclear extracts from different cell types or HL-60 differentiation treatments. The band-shift was efficiently competed with unlabelled probe (Fig. 2C, left), while E10M0 mutation prevented competitive inhibition. The mutations E10M1, 2, 3 competed slightly better than E10M0, but less than wild-type E10 (Table 2), indicating that nuclear factor binding to E10 motif was specific. Moreover a Sp1 dsODN decoy competed efficiently for binding to the probe E10, while a 2 bp mutation of Sp1 dsODN decoy did not affect this gel shift, and an anti Sp1 antibody induced a specific band supershift (Fig. 2C, right). Lastly, two stable transfectant clones obtained with the NR1L E10M0 mutant construct revealed that VitD-induced *NRAMP1* transcription in HL-60 cells was abolished (Fig. 3A); similarly little luciferase expression was detected in



response to differentiation toward neutrophil type (Fig. 3B). Hence, *NRAMP1* E10 site which binds Sp1 *in vitro* is functionally important for the gene transcription *in vivo* during myeloid differentiation.

### **Sp1 influences *in vitro* protein binding at *NRAMP1* promoter *cis*-site E6**

E6 was visualized as a region clearly protected with all the nuclear extracts tested (Fig. 2A, center). It is located downstream of the polymorphic CA dinucleotide repeat (Fig. 2B). E6 binding specificity was demonstrated by competitive EMSA using an excess of cold dsODN E6, whereas the mutation E6M2 specifically abrogated competition (Fig. 2D, Table 2). The E6 DNA sequence is also cytosine-rich and corresponds to a predicted Sp1 site, but addition of an anti Sp1 Ab in the EMSA induced only a weak decrease in intensity of the observed band-shift. Also, moderate binding competition was observed in presence of excess unlabelled Sp1 dsODN decoy, albeit reproducibly, and not with the mutated Sp1 dsODN decoy (Fig. 2D). This competition seemed specific since i) such difference between wild-type and mutated dsODN decoy was not observed with several other factors tested (PU.1, AP-1, Stat, PU-IRF, data not shown), and ii) strong competition was also observed with an excess of cold E10 dsODN, but not E10M0 (Fig. 2D). These data reinforce the possibility that Sp1 contributes to binding interactions to the site E6.

A potential partner for Sp1 binding to *NRAMP1* E6 site was spotted by observing significant competition of nuclear extract binding using a cold excess of dsODN decoy for a member of the Ets family, the Myeloid Elf-1 like Factor (MEF), but not with a mutated MEF binding site (Fig. 2D). Such data suggest that E6 site may bind a combination of transcription factors that could include Sp1 and MEF. Lastly, six stable transfectants with a E6M2 mutated NR1L construct lost transcriptional response to VitD (three shown in Fig. 3A). A spontaneous PCR mutation resulted in a 2bp (CA) deletion in the first E6M2 clones that were obtained (producing *NRAMP1* promoter allele 9 (85)) and lacked VitD response; additional allele 3 mutants lacking this polymorphism were generated to confirm that reduced transcriptional activation was caused solely by the

E6M2 mutation. One of these clones was tested in response to DMSO and showed also reduced transcription (Fig. 3B), albeit less pronounced than that resulting from the destruction of site E10, or a deletion past the 5E3 construct (Fig. 3B). The lack of luciferase induction following differentiation toward neutrophil or macrophage cell types, which resulted from promoter deletion past 5E3 end or from abolition of the sites E6 and E10 (Fig. 3B & 1B, respectively), indicates three *cis* sites that are required for *NRAMP1* regulation in myeloid cells.

### **The site E2 is required for myeloid regulation of *NRAMP1* promoter**

The site E2 appeared as a weak DNase footprint, which seemed better protected in presence of extracts from differentiated HL-60 cells (lane 3 and 4). Protection of E2 site was specific since it was competed by an excess of cold E2 and with the mutated dsODN E2M1, but less strongly with E2M2 (Table 2). E2.2, another dsODN overlapping the site E2M2 was also competed by E2 and E2M1 but not E2M2. *In silico* analysis of the region suggested that E2 could be a composite binding site for an IFN- $\gamma$  Response Factor (IRF), which might allow *NRAMP1* up-regulation in mature phagocytes exposed to IFN- $\gamma$ . However, no competition occurred with PU-IRF, GAS (IFN- $\gamma$  Activating Sequence) and Stats (Signal Transducers and Activators of Transcription, not shown) dsODNs decoys, or with any of the others that were tested in this study (e.g. Sp1). Yet, three independent stable transfectants showed that the mutation E2M2 abrogated *NRAMP1* transcriptional activity *in vivo* in HL-60 cells in response to VitD (Fig. 3A), whereas two clones out of three still conferred luciferase expression in response to DMSO (Fig. 3B).

The E2 site is located between the boundaries of deletion constructs NR1L and 5E3, and although transcriptional activity in HL-60 cells was retained for some 5E3 constructs in response to either VitD or DMSO, luciferase expression was definitely lost past deletion point 5E4 both in monocyte- and neutrophil-like HL60 cells (Fig. 1B & 3B). These data support the possibility that the site E2 participates in *NRAMP1* regulation and suggest the involvement of neighbour sites such as E3. These results establish a regulatory role in

myeloid cells of the promoter region comprised between the ends of NR1L and 5E4 deletion constructs.

### **Sp1 activates *NRAMP1* promoter *in vivo***

To demonstrate that Sp1 contributes to the myeloid regulation of *NRAMP1* gene we first sought for evidence of *in vivo* interaction between this factor and *NRAMP1* promoter. Transient co-transfections were performed in 293T cells using the *NRAMP1* promoter luciferase construct NR1L and vectors encoding Sp1 or Sp3, another Sp1 family member, as well as other candidate transcription factors that might contribute to activate *NRAMP1* transcription in myeloid cells, including VDR, PU.1 and interferon responsive factors IRF4 and 8, which contribute to the regulation of genes that are expressed myeloid cells (56, 80).

In addition, because Sp1 can also interact with proximal elements similar to the CCAAT box in some promoters, we tested additional factors which could also possibly contribute to a basal level of gene transcription. These include some CCAAT enhancer binding proteins (C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$ ), the CCAAT Displacement Protein (CDP/Cux, expressed in immature myeloid cells), and NF-Y A, B and C, which are essential for the recruitment of the RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes (28), and are known to interact with Sp1 (26).

Up-regulation of *NRAMP1* promoter activity in 293T cells was observed upon co-transfection with NR1L construct and an expression plasmid encoding Sp1 (Sp1<sup>+</sup>; Fig. 4A). Sp1 effect appeared specific since Sp3 had a less pronounced effect, and neither VDR nor PU.1, IRF-4 and -8 did demonstrate comparable induction levels in the conditions tested. Besides, when tested in co-transfection combined with Sp1 or PU.1 or both, none of these factors yielded stronger gene activation (Fig. 4A). In contrast, and while co-transfection of NR1L with CDP/Cux p200 did not induce reporter construct activity and could in fact inhibit Sp1 activation, co-transfection with CDP<sub>878-1505</sub>, a construction corresponding to the c-terminal proteolytically processed isoform CDP/Cux

p110 that lacks the inhibitory domain (72, 79) increased transcription, suggesting that CDP/cut p200 isoform may repress *NRAMP1* gene expression. Moreover, clear stimulation of transcription was also observed upon co-transfection of 293T cells with NR1L and C/EBP $\alpha$ <sup>+</sup> plasmids. Lastly, co-transfections with Sp1 and either CDP<sub>878-1505</sub> or C/EBP $\alpha$  both showed slight additive effects, suggesting that CDP<sub>878-1505</sub> or C/EBP $\alpha$  could bind elements different from that bound by Sp1.

### **Sp1 binds *in vivo* myeloid specific determinants of *NRAMP1* promoter**

Since Sp1 can interact with either the distal or proximal parts of the promoters it contributes to regulate, we sought to confirm in 293T epithelial cells the data obtained in myeloid cells, which imply that Sp1 interacts with the upstream region of *NRAMP1* promoter that is required for myeloid regulation. NR1L nested deletion constructs were combined with 200 ng Sp1<sup>+</sup> plasmid to transiently co-transfect 293T cells. The results show that the shortest deletion construct SrS (NR1S) gave the minimal level of Sp1 driven expression while construct 5E4 appeared as active as the full length NR1L (Fig. 4B). However, this construct 5E4 was inactive in HL-60 stable transfectants in response to VitD- and DMSO-induced differentiation (Fig. 1B & 3B), which underscores the contribution of upstream elements to the myeloid-specific regulation of *NRAMP1*. Co-transfection with Sp1<sup>+</sup> and NR1L mutated plasmids E2M2, E6M2 and E10M0 resulted in *NRAMP1* promoter activity that was significantly reduced for the latter only. The data support the proposition that Sp1 interacts with myeloid-specific elements in *NRAMP1* promoter, which are located between deletion points 5E4 and S, including the site E10.

It was hypothesized that the CCAAT binding factors CDP/Cux and C/EBP $\alpha$  could bind elements more proximal to the transcription sites +1 and -28 located within fragment S, and set to compare the *trans*-acting activity of Sp1, CDP, CDP<sub>878-1505</sub> and C/EBP factors when co-transfected with either the myeloid-specific or basal region of *NRAMP1* promoter (Fig. 4C). Contrarily to Sp1 (Fig. 4B), the activity the CCAAT binding factors tested was unaffected by the length of *NRAMP1* promoter fragment (Fig. 4C). Minimal activity was observed after co-transfection with CDP<sup>+</sup> plasmid; this level was up-

regulated about six-fold in co-transfection using instead CDP<sub>878-1505</sub><sup>+</sup> plasmid, consistent with the CCAAT displacement repressor activity of full length (p200) CDP. Co-transfections with C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\epsilon$ <sup>+</sup> plasmids up-regulated *NRAMP1* transcription to levels similar to those obtained with CDP<sub>878-1505</sub><sup>+</sup> plasmid. Combination of Sp1<sup>+</sup> and either CDP<sub>878-1505</sub><sup>+</sup> or C/EBP $\alpha$  and  $\beta$ <sup>+</sup> plasmids resulted in up-regulation of *NRAMP1* promoter activity driven by these factors alone, strictly depending on *NRAMP1* myeloid region. Co-transfection of C/EBP $\alpha$  and Sp3 was less efficient (data not shown). Moreover, the effects of the combinations of Sp1<sup>+</sup> and CDP<sup>+</sup> or C/EBP $\epsilon$ <sup>+</sup> plasmids were not dependent on *NRAMP1* myeloid region, either up- or down-regulating the gene activity compared to the levels in absence of Sp1, but both reduced luciferase activity compared that obtained with Sp1 alone. The results therefore point at a specific interaction between Sp1 bound to *NRAMP1* promoter myeloid region, and some CCAAT-like binding proteins bound to the proximal region, which could modulate *NRAMP1* expression.

### **CCAAT binding proteins bind *in vivo* *NRAMP1* proximal promoter region**

A possible corollary to the results obtained by cotransfecting Sp1<sup>+</sup> and CDP<sup>+</sup> or C/EBP $\epsilon$ <sup>+</sup> plasmids is that the proximal region close to the transcription start site may be essential to the basal transcriptional machinery. This suggestion is supported by two results obtained by different approaches. First, antisense phosphorothioate ODN inhibition of Sp1 expression was used to address the functional role of Sp1 transcription factor in *NRAMP1* regulation in myeloid cells, using both scrambled anti Sp1 and anti Sp3 ODN as controls. The results showed only partial inhibition by anti Sp1 antisense ODN of NR1L driven luciferase activity during VitD-induced HL-60 differentiation (Fig. 5A). Second, data from co-transfection experiments using Sp1<sup>+</sup> plasmid and the mutated NR1L E10M0, which lacks a strong Sp1 binding site, showed that this mutation did not abrogate transcriptional activation (Fig. 4B). Given the prominent role of C/EBP in myeloid cell fate determination, we sought to further test their role on *NRAMP1* proximal promoter by identifying possible sites for C/EBPs within this region and examining the effect of targeted mutagenesis on gene expression.

A candidate motif fitting the consensus for the C/EBP family (20) matched one of the footprints within the basal transcription region, E14, which overlaps the major transcription start site (+1). EMSA using a dsODN spanning the E14 site showed a strong and diffuse band-shift of high molecular weight. Nuclear factor binding was abrogated or strongly diminished by E14M1 and E14M2 mutations, respectively, but not E14M3 (data not shown), which is not part of the predicted site (Table 2). Competitive EMSA with mutated versions of E14 binding site (Fig. 5B, left) confirmed the results of direct binding experiments, indicating that E14M1 mutant should not bind any nuclear factor *in vivo*. Strikingly, the C/EBP dsODN decoy competed strongly E14 for binding of nuclear extracts, whereas the mutated C/EBP decoy had no effect as well as CDP decoy (Fig. 5B, right), and PU.1 and Sp1 decoys (data not shown).

The effect of a mutated E14 site on transcriptional activity was measured by transient co-transfection of 293T cells with construct NR1L E14M1 and Sp1<sup>+</sup>, C/EBPα<sup>+</sup> or both plasmids, and the luciferase levels were compared to those obtained using the NR1L E10M0 mutant in similar conditions (Fig. 5C). While the effect of E10 mutation was detected only in cells co-transfected with Sp1<sup>+</sup> plasmid, the proximal site E14 clearly exerted a major impact on *NRAMP1* transcription. Experiments are currently underway to confirm the prominent role of the site E14 by stable transfection of HL-60 cells.

## Discussion

This study defines several *cis*-acting sequences in *NRAMP1* promoter and identifies some of the corresponding transcription factors, presenting a mechanistic basis to explain the tight restriction of expression of *NRAMP1* gene in mature myeloid cells. The results also provide novel valuable knowledge to interpret human genetic polymorphism in functional terms for diseases resistance either as *NRAMP1* promoter allelic variation or polymorphism in genes encoding the DNA binding factors that regulate transcription in myeloid cells.

Several properties of the *NRAMP1* promoter typify a myeloid promoter: it is compact (~500 bp), lacks canonical TATA or initiator sequences and CCAAT boxes, and shows heterogeneous transcription start sites (77). *NRAMP1* promoter is divided in two regions: one proximal core region spanning the transcriptional start sites, which binds the basic RNA Polymerase II-dependent transcriptional machinery and that drives strong levels of expression in non-myeloid cell types when isolated experimentally; another 5' upstream region, which is required for myeloid expression and regulated by a combination of transcription factors.

Three *cis* acting elements were located in the region required for myeloid-specific control of *NRAMP1* expression, by nested deletion or targeted mutagenesis, followed by stable transfection. The sites E2, E6 and E10 are each required to observe *in vivo* differentiation-dependent *NRAMP1* gene transcription induced with VitD, based on several stably transfected clones per mutation. Both E6 and E10 are also clearly required for gene expression induced by DMSO but differences were noted between E2M2 clones, suggesting a possible influence of the genomic location of the stable insertion during HL-60 differentiation towards neutrophil. These three sites essential for the myeloid regulation of NR1L stable transfectants by VitD are either Sp1-dependent (E10 and E6) or independent (E2). E10 site interaction with Sp1 was demonstrated both *in vitro* (Fig. 2) and *in vivo* (Fig. 4), using a specific mutation E10M0 that impaired DNA binding. The evidence for interaction of E6 with Sp1 was weaker, and absent in the case of E2.

The important role of Sp1 in the control of myeloid gene expression has been recently reviewed (65). More than 15 genes expressed in myeloid cells were shown to be activated by Sp1, including those encoding constituents of phagocytes microbicidal granules and the  $\beta$ 2-leukocytes integrins. This ubiquitously expressed factor also contributes to lineage restricted expression by several mechanisms, including demethylation of Sp1 binding sites (“GC box”) rendering the promoter more accessible in myeloid cells (30), local chromatin structure rearrangement (53, 54), interactions with other nuclear factors and/or post-translational modifications. Hence, predominance of a 30 kDa truncated form of Sp1 was reported in immature HL-60 cells, which could act as a dominant negative factor, while full-length Sp1 105 kDa form was detected after VitD induced differentiation (63).

Sp3 is highly related to Sp1 and although both factors are ubiquitous and can compete for binding to GC boxes, they play non redundant regulatory roles in myeloid cells. Sp3 can act both as activator and inhibitor of transcription while Sp1 is solely an activator (65). It was therefore judged significant to observe *in vivo* differences between these factors both by antisens ODN inhibition of VitD-induced *NRAMP1* gene expression in HL-60 (Fig. 5A) and by co-transfection assays of 293T epithelial cells with NR1L construct (Fig. 4A), which indicated more efficient activation of *NRAMP1* promoter by Sp1. *In vivo* footprinting, which reflects Sp binding to DNA in myeloid cells more accurately than EMSA *in vitro*, and chromatin immuno-precipitation assay will be required to reveal the interactions that are formed between these Sp factors and *NRAMP1* DNA sequence sites *in vivo*, in the context of chromatinized DNA.

A cooperative interaction of Sp1 and PU.1 appears unlikely so far to explain the regulation of *NRAMP1* expression. The deletion of E10 Sp1 binding site resulted in a strong reduction of *NRAMP1* expression during myeloid differentiation of HL-60 cells, and no evidence of direct interaction between PU.1 and *NRAMP1* promoter was obtained by co-transfection assays in 293T cells. In contrast, another ETS family member, MEF, seemed potentially involved in the binding to *NRAMP1* E6 site *in vitro*, possibly in cooperation with Sp1.



Among other factors known to interact with Sp1 in myeloid cells, the three C/EBP factors tested by co-transfection stimulated *NRAMP1* transcription to various extent, but they shared the common property to interact specifically with *NRAMP1* basal transcription region (construct NR1S). C/EBP $\alpha$ , and C/EBP $\beta$  albeit less efficiently, cooperated with Sp1 while C/EBP $\epsilon$  did not. The cooperation of C/EBP $\alpha$  with Sp1 was not observed by combining C/EBP $\alpha$  and Sp3 (data not shown). A C/EBP binding site was defined *in vitro* and *in vivo* (Fig. 5) revealing it was crucial for basal reporter gene expression driven by full-length promoter fragment NR1L.

The combination of Sp1 and C/EBP $\alpha$  is essential for maximal promoter activity in myeloid cells of the genes encoding *LF* and *CD11c* (33, 42). In both cases the C/EBP site was crucial as its inactivation by mutation diminished Sp1 ability to activate reporter gene expression. The data presented here are compatible with a contribution of C/EBPs to recruit the basal transcription machinery at the start site, and a role at distance for Sp1, to activate transcription in myeloid cells. Synergistic transactivation was also reported for Sp1 and C/EBP $\beta$  in HepG2 hepatoma cells (59) and C/EBP $\beta$  was reported to be more active in macrophage than C/EBP $\alpha$ , which is more active in PMN. Since C/EBP $\beta$  is required for VitD induced differentiation of HL-60, we suggest that Sp1 may cooperate with C/EBP $\beta$  to upregulate *NRAMP1* transcription during monocytic differentiation. Neutrophil differentiation could possibly involve a different combination of factors e.g. Sp1 and C/EBP $\alpha$ ; in this respect, the *cis*-element E2 seemed maybe less important during DMSO- vs VitD-induced differentiation. However, both C/EBP $\alpha$  and  $\beta$  bound *in vivo* to the promoters of the myeloid genes *CD14* and *MRP14* (38, 58). Chromatin immunoprecipitation assays directed against different C/EBP factors will be necessary to show those binding to *NRAMP1* promoter during monocytic or granulocytic differentiation of HL-60 cells.

Despite the prominent roles of Sp1 and C/EBP proteins in the myeloid regulation of *NRAMP1* promoter, it is already clear from the *cis* elements identified in this study that additional factors participate in this regulation. Besides the site E2, which binds a Sp1 independent factor that is required for monocytic regulation, the results obtained *in vivo*

in 293T cells with the native CDP and its processed isoform CDP<sub>878-1505</sub> appear interesting. While CDP repressed NR1L promoter activity in 293T cells when co-transfected with Sp1, the CDP<sub>878-1505</sub> isoform clearly stimulated gene expression of the proximal promoter, thus suggesting a possible interaction between CDP and the proximal part of *NRAMP1* promoter.

Whether CDP and C/EBP interact with a single site, as suggested by previous work (3, 34), or whether CDP interacts with a DNA sequence upstream of the activator binding sites, for instance (32, 44), is not yet known, and CDP can bind to a wide range of DNA sequences (72). CDP represses gene transcription by competition for binding site occupancy and its activity is down-regulated during myelo-monocytic maturation (40, 47), particularly during neutrophil development, resulting in up-regulation of C/EBP $\epsilon$  and of several PMN effector genes (LF, neutrophil gelatinase and collagenase) (20). CDP was implicated in several systems as a transcriptional repressor of developmentally regulated genes, and because it can interact with *NRAMP1* promoter *in vivo*, it appears as a likely candidate contributing to the regulation of *NRAMP1* expression during myeloid maturation.

*NRAMP1* transcriptional activation can theoretically result from three mechanisms that are i) recruitment of RNA Polymerase II and associated factors, ii) stimulating the basic transcription machinery associated with the promoter in a pre-initiation complex, iii) recruitment of, and interaction with, chromatin-modifying activities which may facilitate i) or ii) (75). Both Sp1 and CDP can directly modulate chromatin state through interaction with histone acetylase (8, 39). VDR is another obvious candidate for such activity, which can associate with chromatin remodelling enzymes like SRC/p160 and CBP/p300 (61). Although no obvious site for binding VDR was found within *NRAMP1* promoter, and even if stably transfected NR1L fragment suffices to drive gene expression in response to VitD-induced differentiation, any VDR element located elsewhere in the gene might promote at distance the reorganization of *NRAMP1* chromatin environment and modulate the gene expression during myelo-monocytic differentiation.

Considering *NRAMP1* promoter allelic polymorphism, transient co-transfection assays of 293T cells with Sp1<sup>+</sup> plasmid and *NRAMP1* deletions constructs suggested a possible role of the CA repeat, due to impaired promoter activity upon deletion of either part of the repeat or of an immediately upstream element (Fig. 4B). No further evidence was obtained with HL60 stable transfectants partly because deletion of upstream elements already abrogated the gene expression. Additional analyzes aimed at selective manipulation of the CA repeat will be required to address its role during myeloid differentiation.

The polymorphism -237T/C appeared close to a site that was protected from Dnase digestion *in vitro* by incubation with nuclear extracts (E7, data not shown). The replacement of C by T was previously associated with a reduction of the level of luciferase reporter driven by *NRAMP1* allele 3 in response to different stimuli (85). Here, no difference in binding of nuclear extracts to dsODN spanning the site E7 and containing either a T or a C at the relevant position was noted *in vitro*, and E7<sup>T</sup> efficiently competed for nuclear factors binding to E7<sup>C</sup>. A 6-bp linker mutation spanning this position did not affect the capacity to compete with E7<sup>C</sup> for binding nuclear extracts, while competition was abrogated by linker mutagenesis of the 5-10 bp upstream, and to a lesser extent, the upstream bp 11-16 (data not shown). Further *in vivo* studies will be required to characterize the site E7.

Although myeloid-specific expression is a conserved property of human and mouse *NRAMP1* orthologs, the factors involved in such regulation seem to differ between these species. It was reported that the murine *Nramp1* promoter contains two Inr sequences preceded by a proximal Sp1 site and up to six E-boxes (“myc-max”) scattered in the upstream region (9, 10). In addition, it was demonstrated that the restricted expression of *Nramp1* is mediated by the macrophage-specific transcription factor, IRF8 (2), and that a loss-of-function allele of *IRF8* causes susceptibility to infection by impairing *Nramp1*-dependent innate host resistance (80). Whether such differences reflect species divergence (43) or a still limited knowledge of the mechanisms governing *NRAMP1* expression, and the extent of their conservation between human and mouse, will require future studies detailing the regulators of *NRAMP1* expression *in vivo*.



## **Acknowledgment**

We are indebted to the investigators who kindly provided the expression plasmids that were used in this study. This work was supported by a Discovery Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (MFM C, 203297-03). ER was supported by the CIHR-Office of Natural Health Products and the Fondation Armand-Frappier and CC by the Fondation Armand-Frappier.

## **Bibliography**

1. **Abel, L., F. O. Sanchez, J. Oberti, N. V. Thuc, L. V. Hoa, V. D. Lap, E. Skamene, P. H. Lagrange, and E. Schurr.** 1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J Infect Dis* 177:133-45.
2. **Alter-Koltunoff, M., S. Ehrlich, N. Dror, A. Azriel, M. Eilers, H. Hauser, H. Bowen, C. H. Barton, T. Tamura, K. Ozato, and B. Z. Levi.** 2003. Nramp1-mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRF-8, PU.1, and Miz-1. *J Biol Chem* 278:44025-32.
3. **Antes, T. J., S. A. Goodart, C. Huynh, M. Sullivan, S. G. Young, and B. Levy-Wilson.** 2000. Identification and characterization of a 315-base pair enhancer, located more than 55 kilobases 5' of the apolipoprotein B gene, that confers expression in the intestine. *J Biol Chem* 275:26637-48.
4. **Arguello, M., M. Sgarbanti, E. Hernandez, Y. Mamane, S. Sharma, M. Servant, R. Lin, and J. Hiscott.** 2003. Disruption of the B-cell specific transcriptional program in HHV-8 associated primary effusion lymphoma cell lines. *Oncogene* 22:964-73.
5. **Awomoyi, A. A., A. Marchant, J. M. Howson, K. P. McAdam, J. M. Blackwell, and M. J. Newport.** 2002. Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 186:1808-14.
6. **Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, H. C. Whittle, and A. V. Hill.** 1998. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 338:640-4.
7. **Blackwell, J. M., C. H. Barton, J. K. White, S. Searle, A. M. Baker, H. Williams, and M. A. Shaw.** 1995. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med* 1:194-205.
8. **Boekhoudt, G. H., Z. Guo, G. W. Beresford, and J. M. Boss.** 2003. Communication between NF-kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene. *J Immunol* 170:4139-47.

9. **Bowen, H., T. E. Biggs, E. Phillips, S. T. Baker, V. H. Perry, D. A. Mann, and C. H. Barton.** 2002. c-Myc represses and Miz-1 activates the murine natural resistance-associated protein 1 promoter. *J Biol Chem* **277**:34997-5006.
10. **Bowen, H., A. Lapham, E. Phillips, I. Yeung, M. Alter-Koltunoff, B. Z. Levi, V. H. Perry, D. A. Mann, and C. H. Barton.** 2003. Characterization of the murine Nramp1 promoter: requirements for transactivation by Miz-1. *J Biol Chem* **278**:36017-26.
11. **Carey, M., and S. T. Smale.** 2000. *Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies and Techniques*, 1st edition ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. **Cellier, M., C. Shustik, W. Dalton, E. Rich, J. Hu, D. Malo, E. Schurr, and P. Gros.** 1997. Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia. *J Leukoc Biol* **61**:96-105.
13. **Courey, A. J., and R. Tjian.** 1988. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**:887-98.
14. **Delgado, J. C., E. Y. Tsai, S. Thim, A. Baena, V. A. Boussiotis, J. M. Reynes, S. Sath, P. Grosjean, E. J. Yunis, and A. E. Goldfeld.** 2002. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:7576-81.
15. **Dennig, J., G. Hagen, M. Beato, and G. Suske.** 1995. Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* **270**:12737-44.
16. **Dhawan, P., X. Peng, A. L. Sutton, P. N. MacDonald, C. M. Croniger, C. Trautwein, M. Centrella, T. L. McCarthy, and S. Christakos.** 2005. Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase. *Mol Cell Biol* **25**:472-87.
17. **Dubaniewicz, A., S. E. Jamieson, M. Dubaniewicz-Wybieralska, M. Fakiola, E. Nancy Miller, and J. M. Blackwell.** 2005. Association between SLC11A1 (formerly NRAMP1) and the risk of sarcoidosis in Poland. *Eur J Hum Genet*.
18. **Ferreira, F. R., L. R. Goulart, H. D. Silva, and I. M. Goulart.** 2004. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1

- promoter polymorphisms and the lepromin response. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 72:457-67.
19. **Flo, T. H., K. D. Smith, S. Sato, D. J. Rodriguez, M. A. Holmes, R. K. Strong, S. Akira, and A. Aderem.** 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432:917-21.
  20. **Friedman, A. D.** 2002. Transcriptional regulation of myelopoiesis. *Int J Hematol* 75:466-72.
  21. **Gombart, A. F., M. Shiohara, S. H. Kwok, K. Agematsu, A. Komiyama, and H. P. Koeffler.** 2001. Neutrophil-specific granule deficiency: homozygous recessive inheritance of a frameshift mutation in the gene encoding transcription factor CCAAT/enhancer binding protein--epsilon. *Blood* 97:2561-7.
  22. **Grabe, N.** 2002. AliBaba2: context specific identification of transcription factor binding sites. *In Silico Biol* 2:S1-15.
  23. **Greenwood, C. M., T. M. Fujiwara, L. J. Boothroyd, M. A. Miller, D. Frappier, E. A. Fanning, E. Schurr, and K. Morgan.** 2000. Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family. *Am J Hum Genet* 67:405-16.
  24. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51-9.
  25. **Hoal, E. G., L. A. Lewis, S. E. Jamieson, F. Tanzer, M. Rossouw, T. Victor, R. Hillerman, N. Beyers, J. M. Blackwell, and P. D. Van Helden.** 2004. SLC11A1 (NRAMP1) but not SLC11A2 (NRAMP2) polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis in a high-incidence community in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:1464-71.
  26. **Inoue, T., J. Kamiyama, and T. Sakai.** 1999. Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. *J Biol Chem* 274:32309-17.
  27. **Ji, Y., and G. P. Studzinski.** 2004. Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Cancer Res* 64:370-7.



28. **Kabe, Y., J. Yamada, H. Uga, Y. Yamaguchi, T. Wada, and H. Handa.** 2005. NF-Y is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes. *Mol Cell Biol* **25**:512-22.
29. **Kai, H., A. Hisatsune, T. Chihara, A. Uto, A. Kokusho, T. Miyata, and C. Basbaum.** 1999. Myeloid ELF-1-like factor up-regulates lysozyme transcription in epithelial cells. *J Biol Chem* **274**:20098-102.
30. **Kao, W. Y., J. A. Briggs, M. C. Kinney, R. A. Jensen, and R. C. Briggs.** 1997. Structure and function analysis of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen promoter: evidence for the role of Sp1 and not of c-Myb or PU.1 in myelomonocytic lineage-specific expression. *J Cell Biochem* **65**:231-44.
31. **Kel, A. E., E. Gossling, I. Reuter, E. Cheremushkin, O. V. Kel-Margoulis, and E. Wingender.** 2003. MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **31**:3576-9.
32. **Khanna-Gupta, A., T. Zibello, S. Kolla, E. J. Neufeld, and N. Berliner.** 1997. CCAAT displacement protein (CDP/cut) recognizes a silencer element within the lactoferrin gene promoter. *Blood* **90**:2784-95.
33. **Khanna-Gupta, A., T. Zibello, C. Simkevich, A. G. Rosmarin, and N. Berliner.** 2000. Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation. *Blood* **95**:3734-41.
34. **Khanna-Gupta, A., T. Zibello, H. Sun, P. Gaines, and N. Berliner.** 2003. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies indicate a role for CCAAT enhancer binding proteins alpha and epsilon (C/EBP alpha and C/EBP epsilon ) and CDP/cut in myeloid maturation-induced lactoferrin gene expression. *Blood* **101**:3460-8.
35. **Kishi, F., Y. Tanizawa, and M. Nobumoto.** 1996. Structural analysis of human natural resistance-associated macrophage protein 1 promoter. *Mol Immunol* **33**:265-8.
36. **Kojima, Y., Y. Kinouchi, S. Takahashi, K. Negoro, N. Hiwatashi, and T. Shimosegawa.** 2001. Inflammatory bowel disease is associated with a novel promoter polymorphism of natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene. *Tissue Antigens* **58**:379-84.
37. **Kriwacki, R. W., S. C. Schultz, T. A. Steitz, and J. P. Caradonna.** 1992. Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9759-63.

38. **Kuruto-Niwa, R., M. Nakamura, K. Takeishi, and R. Nozawa.** 1998. Transcriptional regulation by C/EBP alpha and -beta in the expression of the gene for the MRP14 myeloid calcium binding protein. *Cell Struct Funct* **23**:109-18.
39. **Li, S., L. Moy, N. Pittman, G. Shue, B. Aufiero, E. J. Neufeld, N. S. LeLeiko, and M. J. Walsh.** 1999. Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *J Biol Chem* **274**:7803-15.
40. **Lievens, P. M., J. J. Donady, C. Tufarelli, and E. J. Neufeld.** 1995. Repressor activity of CCAAT displacement protein in HL-60 myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **270**:12745-50.
41. **Liu, M., M. H. Lee, M. Cohen, M. Bommakanti, and L. P. Freedman.** 1996. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* **10**:142-53.
42. **Lopez-Rodriguez, C., L. Botella, and A. L. Corbi.** 1997. CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins. *J Biol Chem* **272**:29120-6.
43. **Ludwig, M. Z., A. Palsson, E. Alekseeva, C. M. Bergman, J. Nathan, and M. Kreitman.** 2005. Functional evolution of a cis-regulatory module. *PLoS Biol* **3**:e93.
44. **Luo, W., and D. G. Skalnik.** 1996. CCAAT displacement protein competes with multiple transcriptional activators for binding to four sites in the proximal gp91phox promoter. *J Biol Chem* **271**:18203-10.
45. **Ma, X., S. Dou, J. A. Wright, R. A. Reich, L. D. Teeter, H. M. El Sahly, R. J. Awe, J. M. Musser, and E. A. Graviss.** 2002. 5' dinucleotide repeat polymorphism of NRAMP1 and susceptibility to tuberculosis among Caucasian patients in Houston, Texas. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**:818-23.
46. **Marecki, S., M. L. Atchison, and M. J. Fenton.** 1999. Differential expression and distinct functions of IFN regulatory factor 4 and IFN consensus sequence binding protein in macrophages. *J Immunol* **163**:2713-22.
47. **Martin-Soudant, N., J. G. Drachman, K. Kaushansky, and A. Nepveu.** 2000. CDP/Cut DNA binding activity is down-modulated in granulocytes, macrophages and erythrocytes but remains elevated in differentiating megakaryocytes. *Leukemia* **14**:863-73.

48. **Mo, X., E. Kowenz-Leutz, H. Xu, and A. Leutz.** 2004. Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta. *Mol Cell* **13**:241-50.
49. **Nguyen, T. M., M. Lieberherr, J. Fritsch, H. Guillozo, M. L. Alvarez, Z. Fitouri, F. Jehan, and M. Garabedian.** 2004. The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *J Biol Chem* **279**:7591-7.
50. **Nicolas, M., V. Noe, and C. J. Ciudad.** 2003. Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J* **371**:265-75.
51. **Nirodi, C., J. Hart, P. Dhawan, N. S. Moon, A. Nepveu, and A. Richmond.** 2001. The role of CDP in the negative regulation of CXCL1 gene expression. *J Biol Chem* **276**:26122-31.
52. **Norman, A. W., W. H. Okamura, M. W. Hammond, J. E. Bishop, M. C. Dormanen, R. Bouillon, H. van Baelen, A. L. Ridall, E. Daane, R. Khoury, and M. C. Farach-Carson.** 1997. Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol Endocrinol* **11**:1518-31.
53. **Noti, J. D.** 1997. Sp3 mediates transcriptional activation of the leukocyte integrin genes CD11C and CD11B and cooperates with c-Jun to activate CD11C. *J Biol Chem* **272**:24038-45.
54. **Noti, J. D., A. K. Johnson, and J. D. Dillon.** 2000. Structural and functional characterization of the leukocyte integrin gene CD11d. Essential role of Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* **275**:8959-69.
55. **Nuchprayoon, I., J. Shang, C. P. Simkevich, M. Luo, A. G. Rosmarin, and A. D. Friedman.** 1999. An enhancer located between the neutrophil elastase and proteinase 3 promoters is activated by Sp1 and an Ets factor. *J Biol Chem* **274**:1085-91.
56. **O'Reilly, D., C. M. Quinn, T. El-Shanawany, S. Gordon, and D. R. Greaves.** 2003. Multiple Ets factors and interferon regulatory factor-4 modulate CD68 expression in a cell type-specific manner. *J Biol Chem* **278**:21909-19.

57. **Pahl, H. L., R. J. Scheibe, D. E. Zhang, H. M. Chen, D. L. Galson, R. A. Maki, and D. G. Tenen.** 1993. The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem* **268**:5014-20.
58. **Pan, Z., C. J. Hetherington, and D. E. Zhang.** 1999. CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development. *J Biol Chem* **274**:23242-8.
59. **Payton, S. G., J. R. Whetstone, Y. Ge, and L. H. Matherly.** 2005. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier promoter C: synergistic transactivation by Sp1 and C/EBP beta and identification of a downstream repressor. *Biochim Biophys Acta* **1727**:45-57.
60. **Pereira, R. C., A. M. Delany, and E. Canalis.** 2004. CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* **145**:1952-60.
61. **Rachez, C., and L. P. Freedman.** 2000. Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene* **246**:9-21.
62. **Radomska, H. S., C. S. Huettner, P. Zhang, T. Cheng, D. T. Scadden, and D. G. Tenen.** 1998. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* **18**:4301-14.
63. **Rao, J., F. Zhang, R. J. Donnelly, N. L. Spector, and G. P. Studzinski.** 1998. Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells. *J Cell Physiol* **175**:121-8.
64. **Reddy, K. V., K. J. Serio, C. R. Hodulik, and T. D. Bigby.** 2003. 5-lipoxygenase-activating protein gene expression. Key role of CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) in constitutive and tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced expression in THP-1 cells. *J Biol Chem* **278**:13810-8.
65. **Resendes, K. K., and A. G. Rosmarin.** 2004. Sp1 control of gene expression in myeloid cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**:171-81.
66. **Rockman, M. V., and G. A. Wray.** 2002. Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol Biol Evol* **19**:1991-2004.

67. **Roig, E. A., E. Richer, F. Canonne-Hergaux, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2002. Regulation of NRAMP1 gene expression by 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D(3) in HL-60 phagocytes. *J Leukoc Biol* **71**:890-904.
68. **Rosmarin, A. G., M. Luo, D. G. Caprio, J. Shang, and C. P. Simkevich.** 1998. Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem* **273**:13097-103.
69. **Rosmarin, A. G., Z. Yang, and K. K. Resendes.** 2005. Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol* **33**:131-43.
70. **Ross, S. E., H. S. Radomska, B. Wu, P. Zhang, J. N. Winnay, L. Bajnok, W. S. Wright, F. Schaufele, D. G. Tenen, and O. A. MacDougald.** 2004. Phosphorylation of C/EBPalpha inhibits granulopoiesis. *Mol Cell Biol* **24**:675-86.
71. **Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 1998. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn., Plainview, NY.
72. **Moon NS, Premdas P, Truscott M, Leduy L, Berube G and Nepveu A.** 2001. S phase-specific proteolytic cleavage is required to activate stable DNA binding by the CDP/Cut homeodomain protein. *Mol Cell Biol* **21**: 6332-45.
73. **Searle, S., and J. M. Blackwell.** 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet* **36**:295-9.
74. **Soborg, C., A. B. Andersen, H. O. Madsen, A. Kok-Jensen, P. Skinhoj, and P. Garred.** 2002. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. *J Infect Dis* **186**:517-21.
75. **Struhl, K.** 2005. Transcriptional activation: mediator can act after preinitiation complex formation. *Mol Cell* **17**:752-4.
76. **Suico, M. A., T. Koga, T. Shuto, A. Hisatsune, Z. Lu, C. Basbaum, T. Okiyoneda, and H. Kai.** 2004. Sp1 is involved in the transcriptional activation of lysozyme in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **324**:1302-8.
77. **Tenen, D. G., R. Hromas, J. D. Licht, and D. E. Zhang.** 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**:489-519.

78. **Truscott, M., L. Raynal, P. Premdas, B. Goulet, L. Leduy, G. Berube, and A. Nepveu.** 2003. CDP/Cux stimulates transcription from the DNA polymerase alpha gene promoter. *Mol Cell Biol* **23**:3013-28.
79. **Truscott, M., L. Raynal, Y. Wang, G. Berube, L. Leduy, and A. Nepveu.** 2004. The N-terminal region of the CCAAT displacement protein (CDP)/Cux transcription factor functions as an autoinhibitory domain that modulates DNA binding. *J Biol Chem* **279**:49787-94.
80. **Turcotte, K., S. Gauthier, A. Tuite, A. Mullick, D. Malo, and P. Gros.** 2005. A mutation in the Icsbp1 gene causes susceptibility to infection and a chronic myeloid leukemia-like syndrome in BXH-2 mice. *J Exp Med* **201**:881-90.
81. **Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros.** 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**:469-85.
82. **Vidal, S. M., E. Pinner, P. Lepage, S. Gauthier, and P. Gros.** 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J Immunol* **157**:3559-68.
83. **Ward, P. P., and O. M. Conneely.** 2004. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* **17**:203-8.
84. **Xie, H., M. Ye, R. Feng, and T. Graf.** 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* **117**:663-76.
85. **Zaahl, M. G., K. J. Robson, L. Warnich, and M. J. Kotze.** 2004. Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)<sub>n</sub> repeat: opposite effect in the presence of -237C-->T. *Blood Cells Mol Dis* **33**:45-50.
86. **Zeng, W., and E. Remold-O'Donnell.** 2000. Human monocyte/neutrophil elastase inhibitor (MNEI) is regulated by PU.1/Spi-1, Sp1, and NF-kappaB. *J Cell Biochem* **78**:519-32.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1. General organization and activity of *NRAMP1* proximal promoter.** **A.** Identification of the major transcriptional start site (TSS) by S1 protection assay (+1, located 147 bp upstream of the ATG), and several minor TSS either adjacent or 28 bp upstream in HL-60 cell line differentiated with the VitD genomic analog KH for three days. **B.** *NRAMP1* transcriptional activity in HL-60 clones, identified by numbers, which were stably transfected with promoter constructs of the indicated length relative to the +1 site. Transcriptional activation was measured by luminometry and expressed as relative luciferase units (RLU) fold induction between cells untreated and cells treated for 3 days with VitD; the mean +/- standard error (SE) of at least three independent experiments is presented. **C.** Schematic map of the promoter regions studied, and delineation of a segment between 5E3 & 4 that is required for transcriptional activation in response to VitD.

**Fig. 2. Sp1 binding *in vitro* to *NRAMP1* promoter site E10.** **A.** DNase digestion footprints of 3 putative *cis* elements E10, E6 and E2 that bind nuclear extracts from various cell types: HL-60 cells, lane 2, HL-60 cells treated with  $10^{-8}$  M KH for 4 days and activated with IFN $\gamma$ , lane 3, HL-60 cells treated for 6 days with 1.25% DMSO, lane 4, and Jurkat lymphoid T cells, lane 5; lane 1, control with no extracts. A sequencing ladder run in parallel was used to locate the protected sites, indicated with a vertical bar. **B.** The sites E2, E6 and E10 are located in the upstream region of *NRAMP1* promoter that is required for myeloid expression and the polymorphic CA repeat is adjacent to the downstream E6 site. **C&D.** EMSA using *cis* elements E10 and E6 and nuclear extracts from HL-60 cells treated with KH and IFN $\gamma$ . Fifty-fold excess, or as indicated, of either cold dsODN and an inactive linker mutated version (E10 and E10M0, E6 and E6M2, Table 2) or specific dsODN decoy and their mutated inactive counterpart (Sp1 and Sp1 mt, MEF and MEF mt) were used in competitive EMSA to characterize the specific band shifts, indicated by an open arrowhead. NS, non specific. Band super-shift (SS) were obtained in presence of an anti-Sp1 antibody or goat anti-IgG control Ab.

**Fig. 3. The *cis* elements E10, E6 and E2 are required for *NRAMP1* promoter transcriptional activation during myeloid differentiation.** HL-60 clones obtained by stable transfection with NR1L promoter constructs containing sites inactivated by linker mutagenesis E2M2, E6M2 and E10M0, identified by numbers, were used to measure RLU fold induction between untreated cells and cells treated for 3 days with KH, producing monocyte-like cells (A), or DMSO to generate neutrophils (B). The transcriptional response to DMSO was also measured for the nested deletions constructs (HSRL, 5E3, 5E4, M-1 and SrS). The mean +/- SE of at least three independent experiments is presented.

**Fig. 4. *In vivo* transactivation of *NRAMP1* promoter by Sp1 requires the myeloid upstream region while transactivation by CCAAT-like binding proteins depends on the basal region.** A. Transient co-transfections in 293T cells of pGL3NR1L promoter construct with expression plasmids encoding various transcription factors assayed sole or in combination. Transcriptional activity is expressed in RLU fold-induction in presence of trans acting factors, compared to the activity of NR1L promoter alone. B. Transient co-transfections of NR1L promoter deletion constructs or linker-mutation constructs together with Sp1<sup>+</sup> plasmid were used to measure transcriptional activation by luminometry (RLU). C. RLU fold induction obtained by co-transfecting NR1L or NR1S with transcription factors assayed alone or combined, compared to the basal activity of NR1L alone. The data presented represent the mean +/- SE of at least three independent experiments.

**Fig. 5. The basal promoter region *cis* element E14 is essential for *NRAMP1* transactivation.** A. Antisense ODN directed against Sp1, Sp3 or scrambled (AS) were used to treat for 24 h the HL-60 clone HSRL5, which was previously differentiated for 3 days with KH, and RLU were determined by luminometry. Asterix indicate a significant difference between samples in a student T test ( $P < 0.05$ ) B. Nuclear extracts from HL-60 cells differentiated with KH and activated with IFN $\gamma$  were incubated with labeled E14 dsODN for EMSA and competitive EMSA to demonstrate a specific band shift (indicated by an open arrowhead) and strong effect of mutation E14M1 on *trans* acting factors binding *in vitro*. C. Transient co-transfections in 293T cells of two linker mutations of



*NRAMP1* promoter construct NR1L (E10M0 or E14M1) with either carrier DNA, or expression plasmids encoding Sp1, C/EBP $\alpha$  or both. RLU fold induction was determined by comparison with the basal activity of wild-type NR1L alone. The data presented in **A** and **B** are the mean  $\pm$  SE of at least three independent experiments.

**Fig. 6. *NRAMP1* proximal promoter features.** The five *cis* elements that were located in this study within the 647 bp *NRAMP1* proximal promoter are indicated, with either the dsODN that were used in EMSA (overline) and the linker-mutations abrogating trans acting factors *in vitro* (6 bp, bold); E2, E6, E10 were demonstrated to be required for *NRAMP1* promoter trans-activation *in vivo* during HL-60 differentiation, and E14 was essential for *NRAMP1* promoter activity in 293T cells. E3 element that is necessary for myeloid expression was located between boundaries of the deletion constructs 5E3 and 5E4. The major transcriptional start site (TSS), as well as another upstream, are indicated by boxed bases and the 63-mer probe used for mapping with S1 nuclease is indicated. The polymorphic CA repeat is shown (shaded) as well as CpGs (bold, italic), which are found mainly clustered in the basal promoter region. The initiation codon is indicated by ATG.

**Table 1 Oligonucleotides**

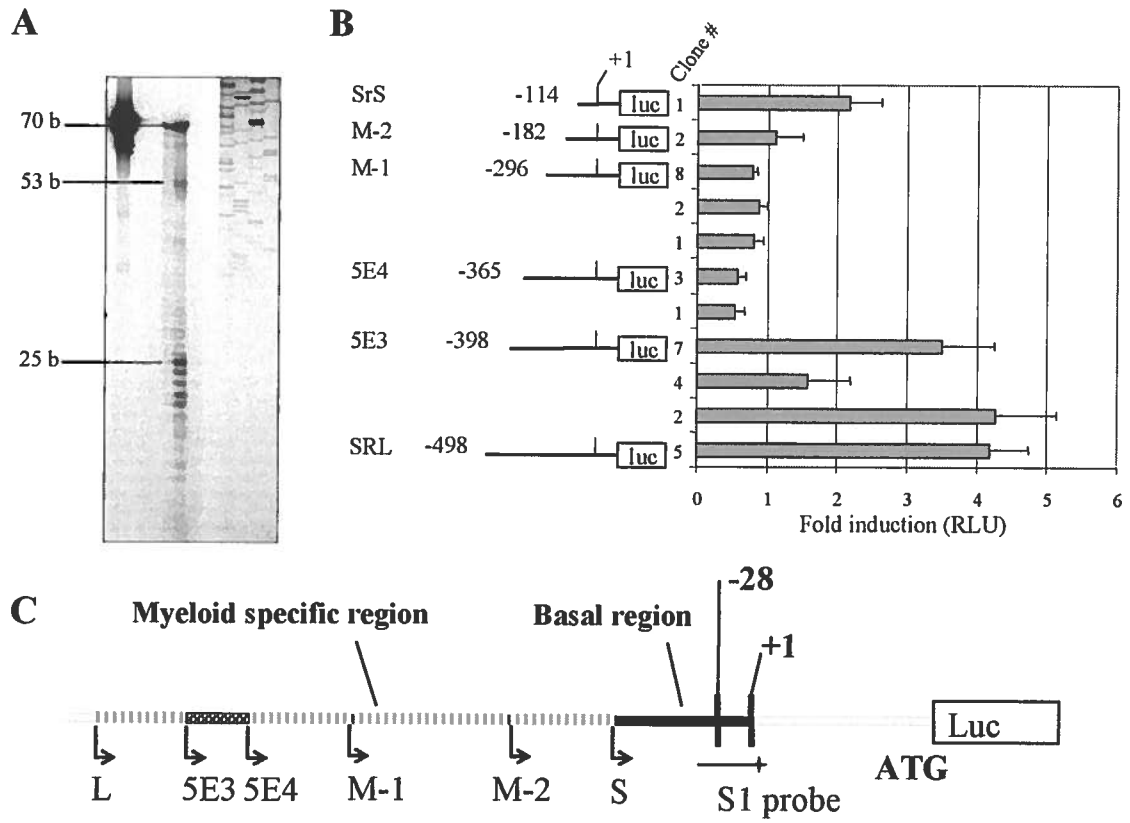
Footprinting Oligonucleotides	
F1F	5'- tag ccc ggg ctc gag atc -3'
F1R	5'- CCA GGC ACC CCG TGT TCT -3'
F2F	5'- tgt acg tgt gtg tgt gtg -3'
F2R	5'- TCG GCC GAT TCA CAC ACA -3'
F3F	5'- CAG AAC ACG GGG TGC CTG -3'
F3R	5'- TCT GGG CAC TGG TGC AAG -3'
S1 nuclease oligonucleotide	
NR1S1	5' GCA GCC GAG TGC CCT GCC TCT TAC ATC AAC ATT CGG TTC ACA TCG GCC GAT TCA CAC ACA CAC gtct ggc -3'
Cloning Oligonucleotides	
RVP3	5' cta gca aaa tag gct gtc cc 3'
LucIR	5' TCT CCA GCG GTT CCA TCT TC 3'
5'E3	5'- aag cc C tCg agg aca tga ag -3'
5'E4	5'- cca acT CgA ggt ctt gga ac -3'

**Table 2 Specific Electromobility shifts**

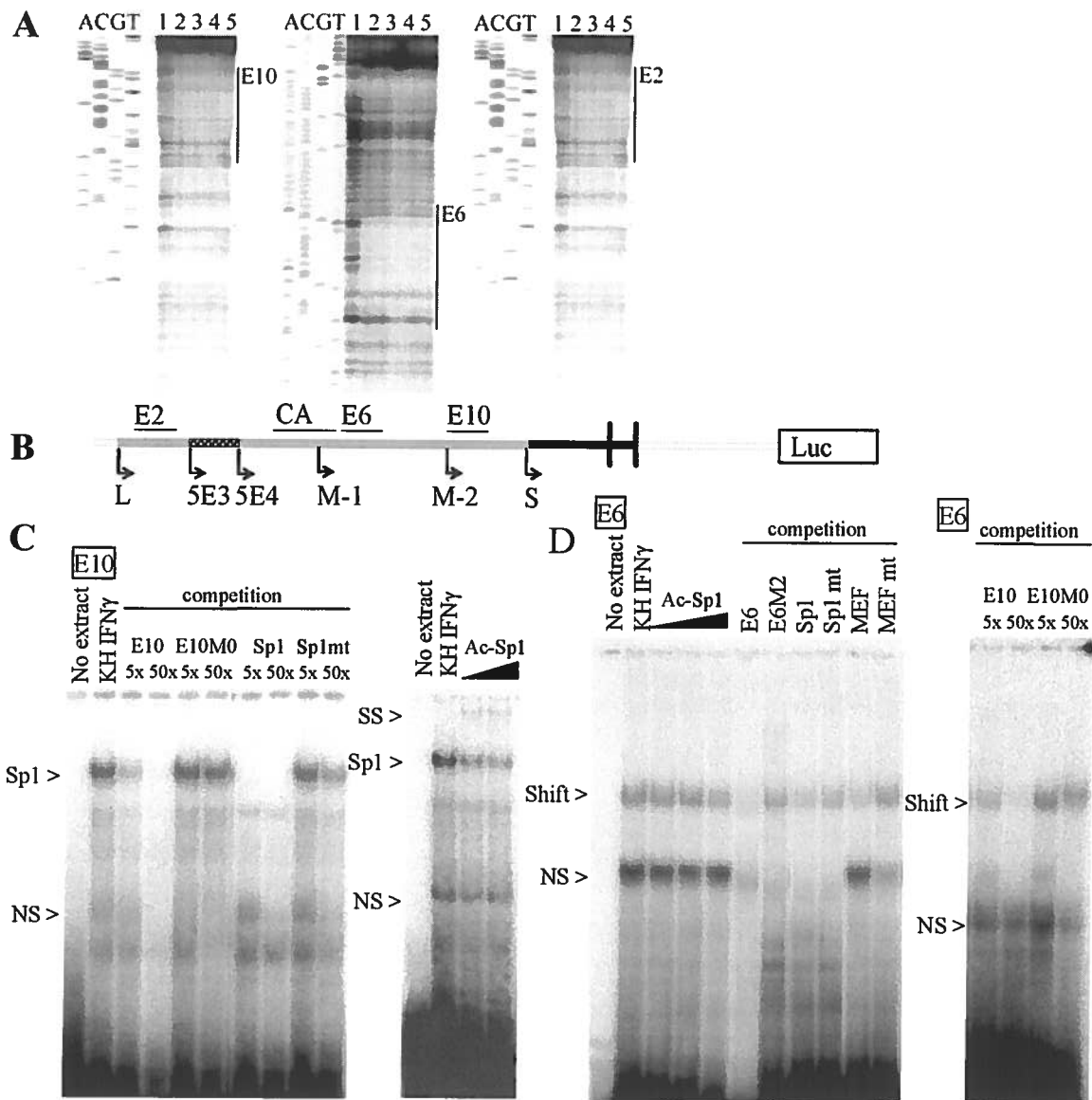
Motif	Sequence	Predicted site	Decoy
E2	5' ttc ctc tgt ggc cct caa agg <u>gaa act</u> gaa 3'	IRF	+
E2M1	5' ttc ctc tgt ggA GTC GCa agg <u>gaa act</u> gaa 3'		+
E2M2	5' ttc ctc tgt ggc cct caa TCA CTG <u>act</u> gaa 3'		-
E2.2	5' ctc aaa ggg aaa ctg aag cct tga gga cat 3'	IRF	+
E6	5' gtg gca gag ggg ggt gtg gtc <u>atg ggg</u> tat 3'	SP1	++
E6M1	5' gtg gTC AGC Tgg ggt gtg gtc <u>atg ggg</u> tat 3'		+
E6M2	5' gtg gca gag gTA CTC Ctg gtc <u>atg ggg</u> tat 3'		-
E6M3	5' gtg gca gag ggg ggt <u>gAC TCT</u> Ctg ggg tat 3'		+/-
E6M4	5' gtg gca gag ggg ggt gtg gtc <u>aCA TCA</u> Cat 3'		++
E10	5' cac agg gca ggc tgg <u>gag ggg</u> aac aaa ggt 3'	<u>SP1</u> PU.1	++
E10M0	5' cac agg gca CTA GCA <u>gag ggg</u> aac aaa ggt 3'		-
E10M1	5' cac agg gca ggc GCA TGC ggg aac aaa ggt 3'		+/-
E10M2	5' cac agg gca ggc tgg <u>gag</u> CAT GTG aaa ggt 3'		+/-
E10M3	5' cac agg gca ggc tgg <u>gag ggg</u> GTG CTT ggt 3'		+/-
E14	5' tga acc gaa tgt tga tgt aag agg cag ggc 3'		++
E14M1	5' tga acc gaa CTA GCT tgt aag agg cag ggc 3'		+/-
E14M2	5' tga acc gaa tgt tga CAG TCA agg cag ggc 3'		+/-
E14M3	5' tga acc gaa tgt tga tgt aag CTA GTC ggc 3'		++

# Figures

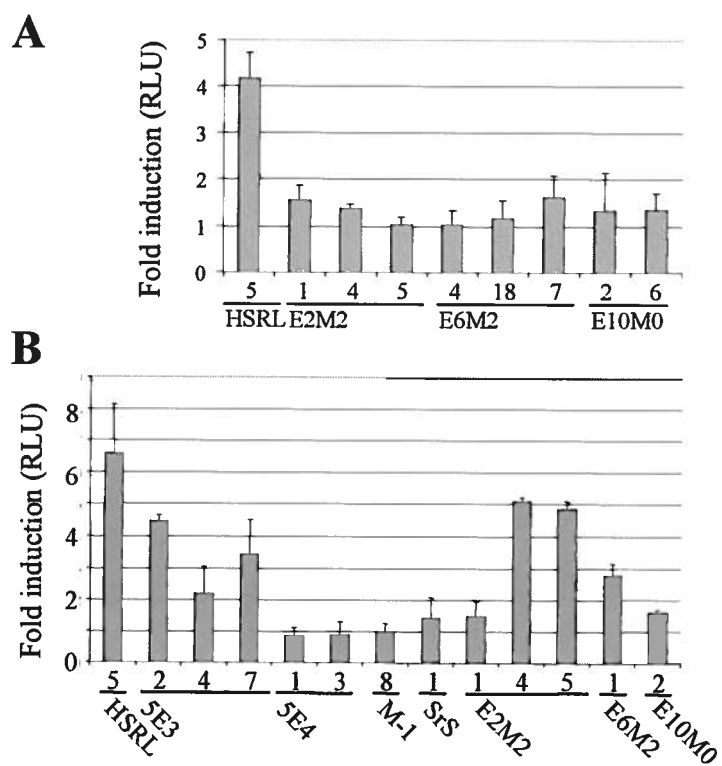
## Figure 1



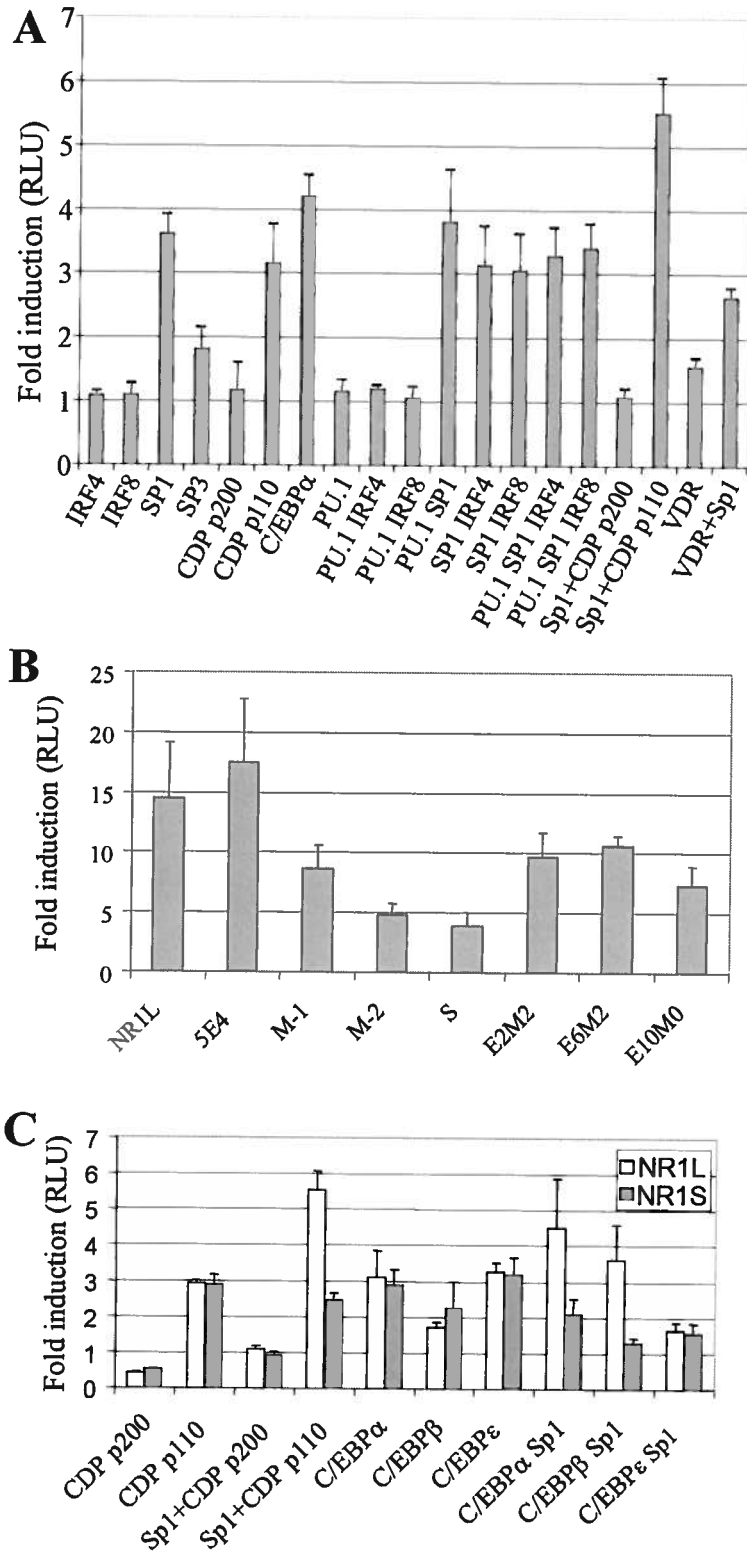
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

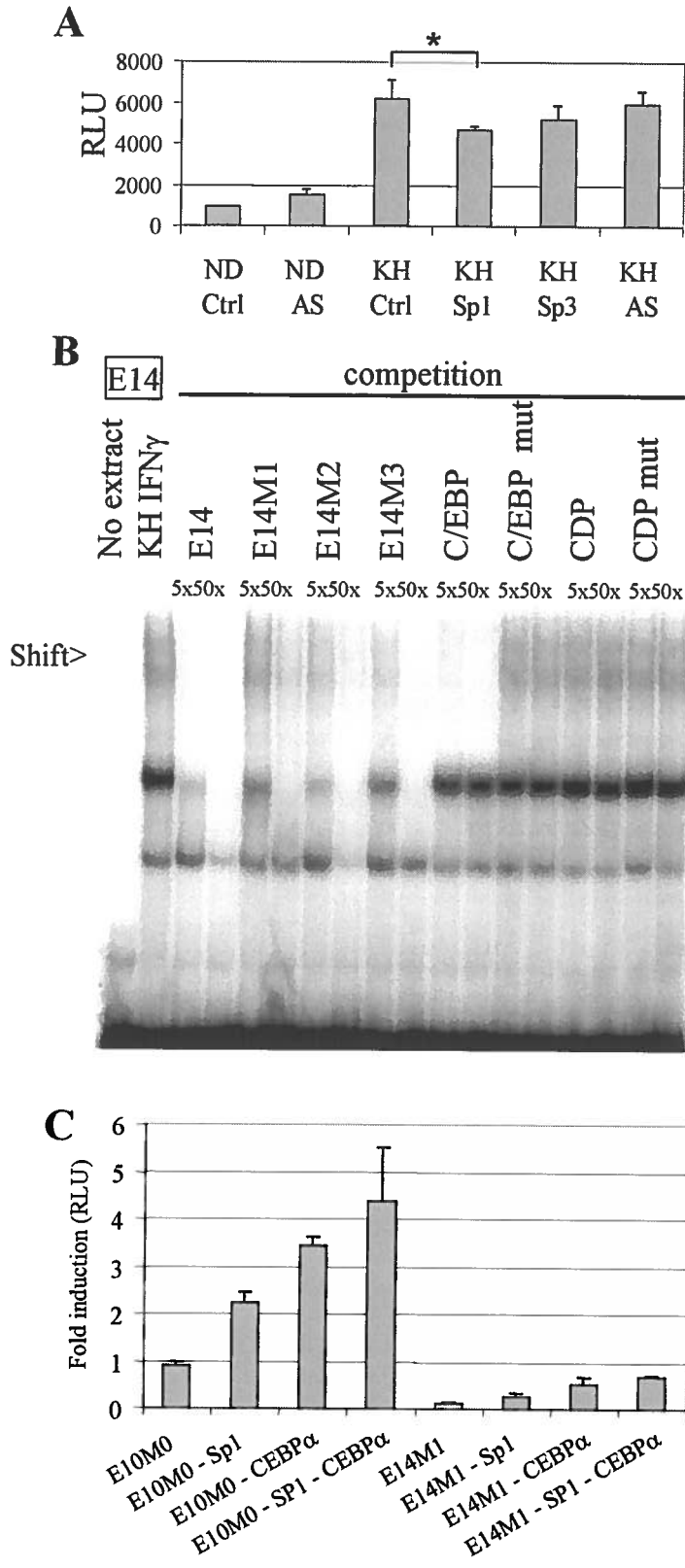
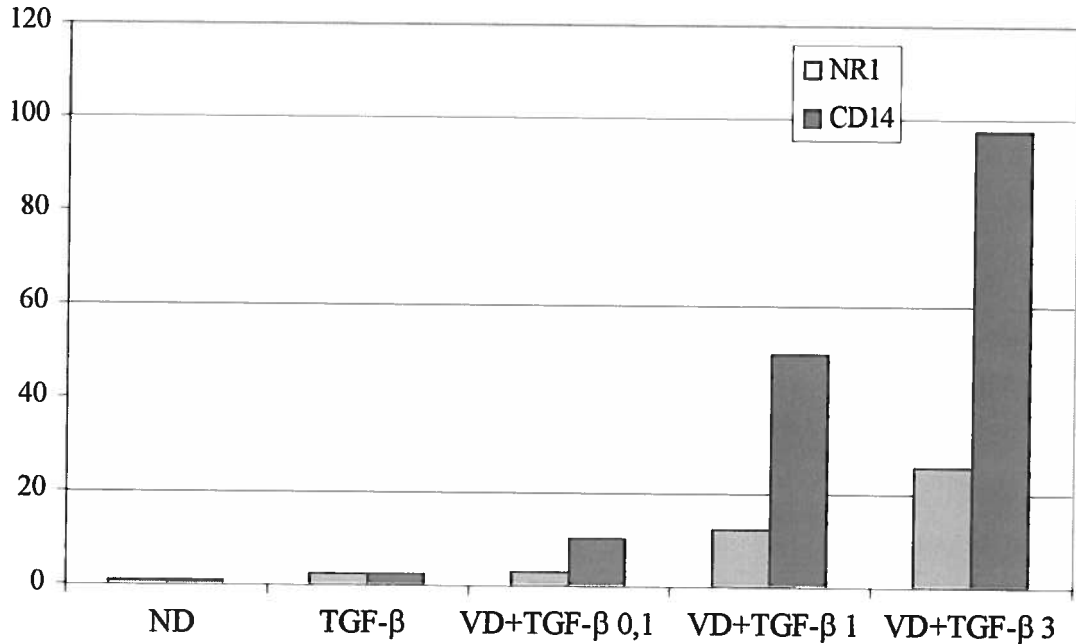




Figure 6

**L**  
agtgccccatcttctg<sup>5E2</sup>ggga<sup>ca repeat</sup>cg<sup>5E3</sup>tccctgggtctgaatcttcaatgcatgtcccttctgcagtgccctcctctg  
**M E2**  
tggccctcaa<sup>5E4</sup>agggaaactgaagcctttgaggacatgaagact<sup>5E4</sup>cg<sup>5E4</sup>cattaggccaac<sup>5E4</sup>aggggtcttggaac  
**E6**  
tccagatcaaagagaataagaaagacctgactct<sup>M-1</sup>t<sup>M-1</sup>gtgg<sup>M-1</sup>gggtg<sup>M-1</sup>ga<sup>M-1</sup>cg<sup>M-1</sup>tgt<sup>M-1</sup>gtg<sup>M-1</sup>ga<sup>M-1</sup>cg<sup>M-1</sup>tgtg<sup>M-1</sup>gtg<sup>M-1</sup>gtg<sup>M-1</sup>gtg<sup>M-1</sup>  
**E6**  
gtg<sup>E6</sup>tggcagaggggg<sup>E6</sup>gtg<sup>E6</sup>gtgc<sup>E6</sup>atgggggtattgacatgaatatgcaaggggcaggaagcatctgaaatcag  
**M-2**  
agctaacttgggagggcacagaaca<sup>M-2</sup>gggg<sup>M-2</sup>gcctggaaggggaaacagatgtgttgtgggg<sup>E10</sup>ca<sup>E10</sup>agggcaggc  
**S**  
**S1 specific 63-mer**  
tgggaggggaacaaagg<sup>S</sup>tccactccatggg<sup>S</sup>taaccagacccttc<sup>S</sup>cgccagg<sup>S</sup>gctggccacttctgcctttgg  
**E14**  
aaaatg<sup>-28</sup>ttcacaacgccccatgttgtgtgtgtgtg<sup>-28</sup>gaatcg<sup>-28</sup>gcgatgtgaac<sup>E14</sup>cg<sup>-28</sup>aatgttga<sup>E14</sup>tgtgaaga<sup>+1</sup>  
**E14**  
ggcagggcact<sup>E14</sup>cg<sup>-28</sup>gctg<sup>-28</sup>cg<sup>-28</sup>gatgggtaacaggg<sup>-28</sup>cg<sup>-28</sup>tgggctggcacacttacttgcaccagtgcc<sup>E14</sup>agagag  
**Met**  
ggggtgcaggctgaggagctgccagagcac<sup>E14</sup>cg<sup>-28</sup>ctcacactcccagagtacctgaagt<sup>E14</sup>cg<sup>-28</sup>gcatttcc<sup>ATG</sup>

## Chapitre 5 : Résultats supplémentaires



**Figure supplémentaire 1** (p.196)

Quantification d'un Northern blot démontrant l'accumulation de l'ARNm de *NRAMP1* et de *CD14* dans les cellules HL-60 en réponse à une différenciation de cinq jours induite par la VD (10nM) en combinaison avec des concentrations croissantes de TGF-β. Le niveau d'expression est quantifié à l'aide d'un appareil Phosphor Imager (GE Healthcare) et normalisé en fonction du taux d'expression de la *GAPDH*. Le niveau d'activité dans les cellules non-différenciées est fixé à 1.

Sonde E2

Sonde E2.2

Extrait KH IFN $\gamma$

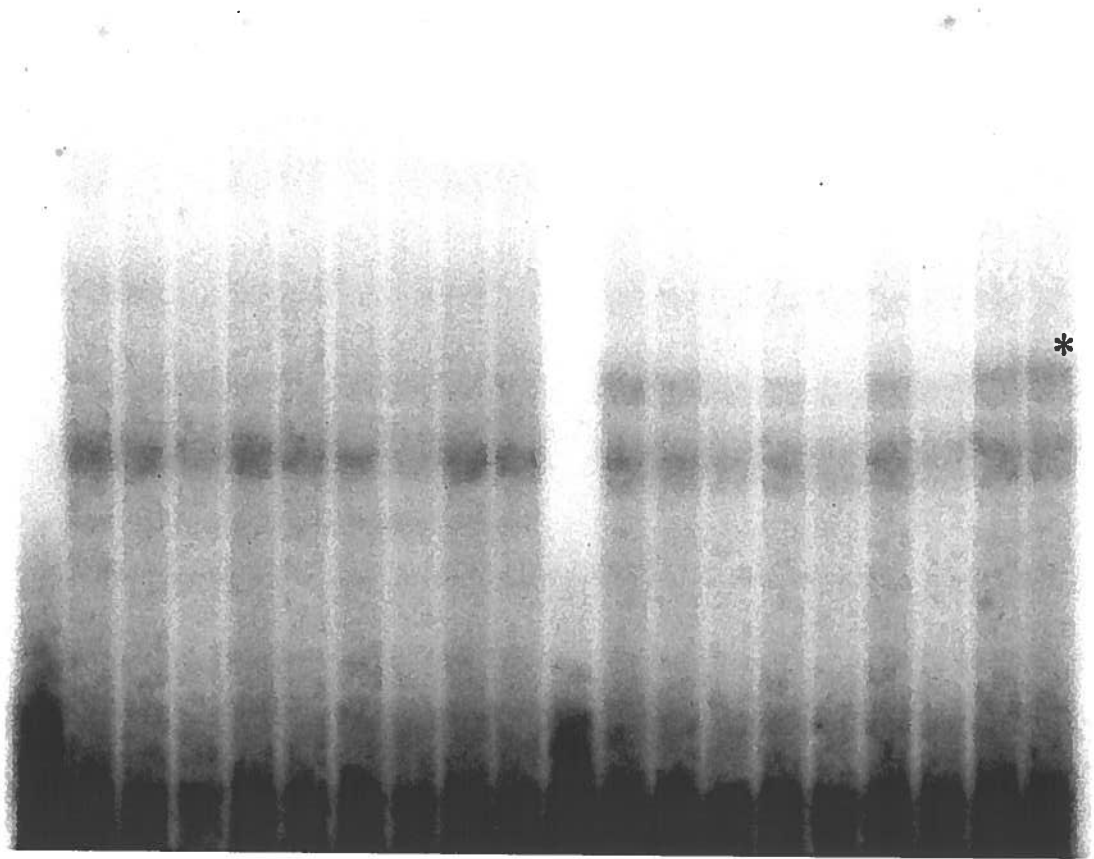
Extrait KH IFN $\gamma$

compétition

compétition

E2 E2.2 E2M1 E2M2  
5X 50X 5X 50X 5X 50X 5X 50X

E2 E2.2 E2M1 E2M2  
5X 50X 5X 50X 5X 50X 5X 50 X



	E2M1	E2M2
E2	5' ttccctctgtggccctcaaagggaaactgaa 3'	
E2.2	5' ctcaaagggaaactgaagccttgaggacat 3'	

**Figure supplémentaire 2** (p.201 et p.204)

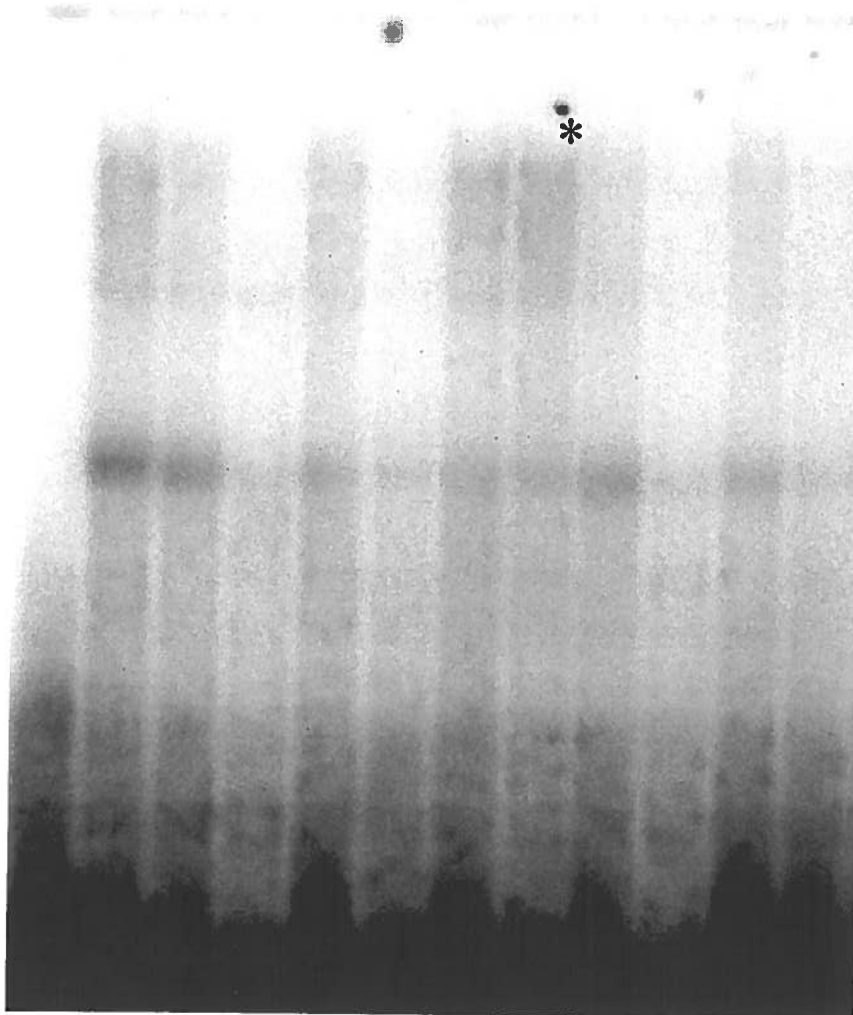
Retard sur gel démontrant l'absence de liaison des protéines nucléaires au site E2M2. La spécificité du retard apparaît a priori assez faible, la compétition de E2 par lui-même n'est que partielle, la mutation E2M2 compétitionne toutefois moins E2. Le fragment chevauchant E2.2 permet de confirmer l'effet de la mutation E2M2. Dans ce cas, les fragments E2 et E2.2 font compétition au fragment E2.2 marqué tandis que la mutation E2M2 abolit la capacité de compétition de l'oligonucléotide froid.

## Sonde E3

### Extrait KH IFN $\gamma$

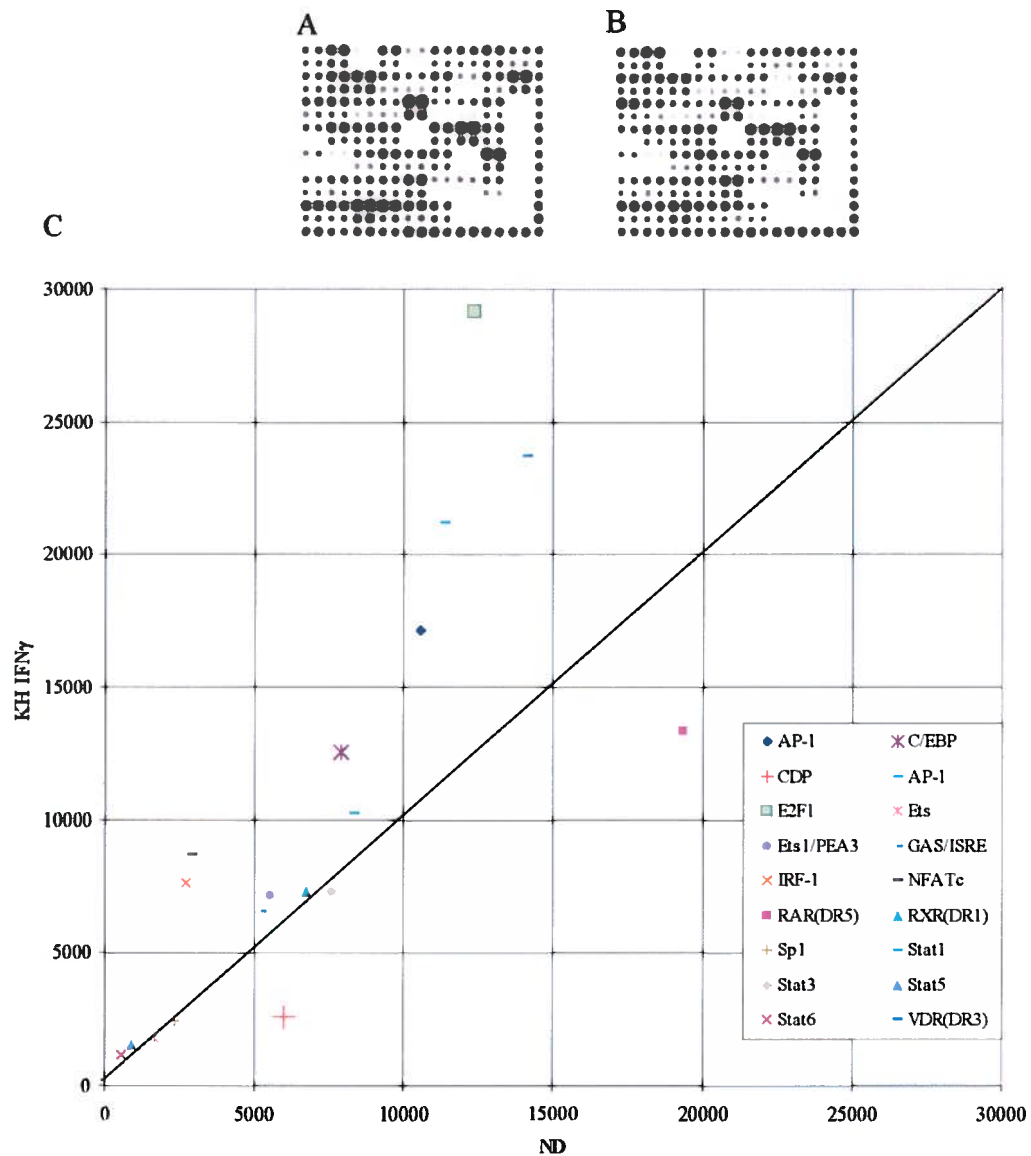
#### compétition

E3	E3M1	E3M2	E3M3	E3M4
5X 50X	5X 50X	5X 50X	5X 50X	5X 50X



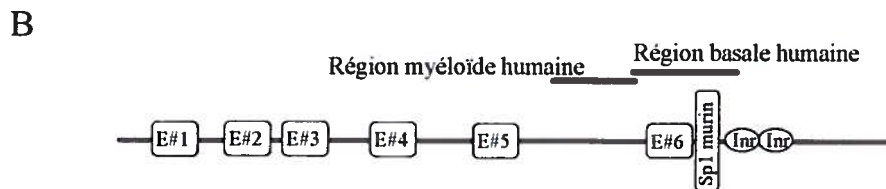
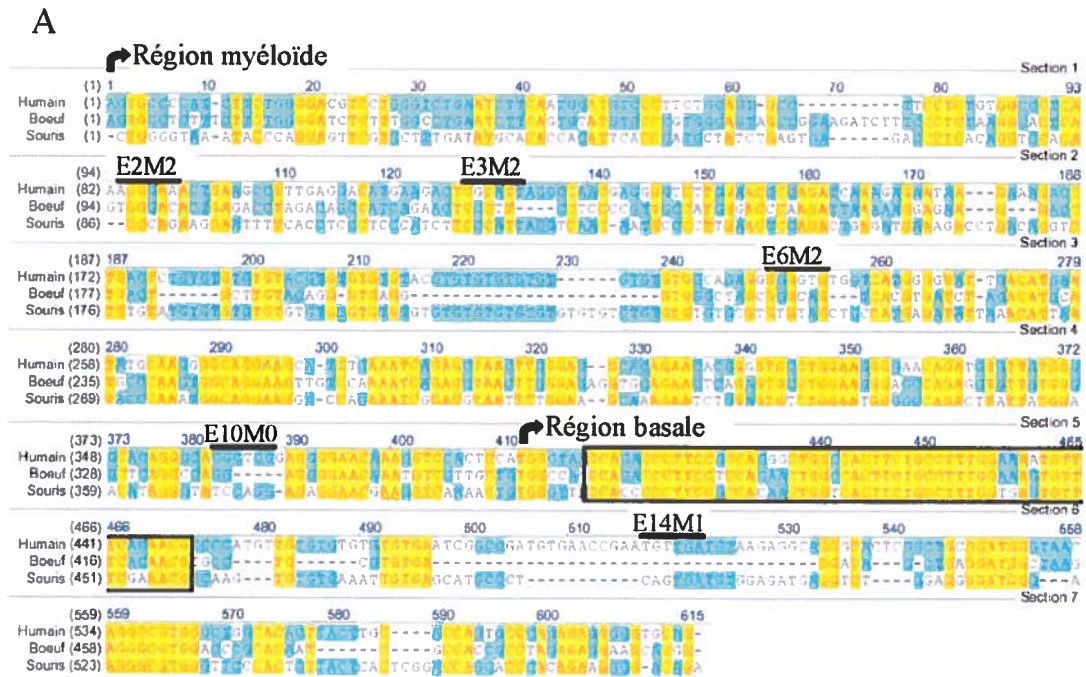
**Figure supplémentaire 3** (p.201 et p.205)

Retard sur gel qui montre l'absence de la liaison des protéines nucléaires au site E3M2. La compétition avec la sonde E3 froide démontre la spécificité du retard sur gel tandis que la mutation E3M2 affecte la liaison du facteur liant la sonde E3 puisqu'un excès de la version mutée ne permet plus de modifier le retard sur gel. Cet effet est spécifique à la mutation E3M2, les mutations E3M1, E3M3 et E3M4 compétitionnant toujours la sonde native avec la même efficacité.



**Figure supplémentaire 4** (p.207)

Analyse de l'activité de liaison des protéines nucléaires de cellules HL-60 différenciées 3 jours avec VitD et IFN- $\gamma$  (A) ou non (B) obtenue avec la membrane TransSignal de Panomics. Les extraits nucléaires sont mis en présence de sondes d'ADN possédant des sites consensus pour la liaison de différents facteurs. Après digestion des sondes non protégées à la DNase, l'analyse des sondes protégées se fait par hybridation ADN-ADN sur une membrane révélée par chimioluminescence. L'intensité du signal est quantifiée avec l'appareil Phosphor Imager et le logiciel ImageQuant (C) permet ensuite de quantifier l'intensité du signal.



**Figure supplémentaire 5** (p.208)

Alignement des promoteurs des gènes *NRAMP1* humain, murin et bovin qui démontre la présence d'un bloc de séquence hautement conservé situé dans la région basale de transcription (A). L'alignement présenté ici a été effectué avec le logiciel AlignX (Vector NTI version 7, Informax) et correspond à l'alignement obtenu avec ClustalW v1.83. Caractéristiques du promoteur murin tiré de (Bowen *et al.* 2003) démontrant l'absence d'éléments régulateurs du promoteur murin dans la section du promoteur correspondant à la région qui confère la spécificité myéloïde du promoteur humain (B).

## Chapitre 6 : Discussion

### *Régulation de l'expression de NRAMP1*

En dépit de l'homologie de structure et de fonction entre NRAMP1 et NRAMP2, ces deux protéines exercent des rôles nettement différents, NRAMP1 étant associée à l'immunité innée et NRAMP2 à l'homéostasie du fer (voir section 1.3). Il apparaît donc que la duplication du gène *NRAMP* après la radiation des mammifères (Cellier *et al.* 2001; Richer *et al.* 2003; Burge *et al.* 2004), puis la spécialisation du rôle des deux homologues, s'est principalement effectuée au niveau de la régulation de l'expression de la protéine et de sa localisation dans la cellule. C'est donc dans ce contexte que nous avons entrepris l'analyse de la régulation de l'expression de NRAMP1 lors de la différenciation terminale myéloïde.

### *Contrôle transcriptionnel*

La protéine a été détectée dans les cellules myéloïdes matures qui expriment un taux élevé d'ARNm de *NRAMP1*. Nous avons démontré dans un premier temps que l'accumulation de l'ARNm de *NRAMP1* est tardive par rapport à l'expression de *CD14* dans le modèle cellulaire HL-60 lors de la différenciation cellulaire induite par la VD (article 1 Fig.1). L'expression du messenger lors de la différenciation terminale monocyttaire induite par le PMA ou la VD de même que la différenciation granulocytaire induite par le DMSO, toujours dans HL-60, avaient été préalablement démontrées (Cellier *et al.* 1997). Toutefois la cinétique d'induction n'était pas connue. Les résultats obtenus indiquent que le taux d'accumulation de l'ARNm augmente progressivement avec la différenciation cellulaire. Ceci est en accord avec l'augmentation de l'expression du messenger observée lors de la différenciation *in vitro* des monocytes isolés du sang périphérique et lors de la migration des monocytes du sang vers les alvéoles pulmonaires, migration qui concorde avec leur différenciation en macrophages alvéolaires (Cellier *et al.* 1997). Puisque la demie-vie du messenger est approximativement de 4h (article 1,

Fig.2), l'augmentation de l'activité transcriptionnelle semblait donc bel et bien responsable de l'accumulation du messager, plutôt que la stabilisation de ce dernier.

Cette augmentation d'expression fut observée directement par transfection dans la lignée cellulaire HL-60. Un fragment de 647 pb en amont de l'ATG fusionné avec le rapporteur de la luciférase est plus fortement exprimé en transfection transitoire (article 1 Fig.5) que des fragments plus courts ou plus long et sa transcription est stimulée dans des cellules HL-60 préalablement différenciées avec KH pendant 3 jours. De plus, des transfectants stables de cette même construction reproduisent le niveau d'activation du messager tant en dose-réponse au jour 3 qu'en cinétique de différenciation sur 5 jours (article 1 Fig.6).

L'analyse de l'expression du messager en réponse à une co-stimulation VD et TGF- $\beta$  montre une forte synergie entre les deux inducteurs, le taux d'induction en réponse à la VD étant équivalent à celui en réponse au TGF- $\beta$  seul (Fig. suppl. 1). Le TGF- $\beta$  augmente l'expression du VDR tandis que la VD, ou ses analogues génomiques, augmentent l'expression des récepteurs du TGF- $\beta$  1 et 2 (Jung *et al.* 1999; Cao *et al.* 2003). Le TGF- $\beta$  favorise également l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 en inhibant la phosphorylation de la protéine Rb (section 1.5.4.3) (Defacque *et al.* 1999; Hu et Zuckerman 2001) et en agissant sur p27<sup>kip</sup> (Hu *et al.* 2001). Tout comme VD, TGF- $\beta$  permet de bloquer la maturation des cellules dendritiques (Lyakh *et al.* 2005). Cette synergie entre TGF- $\beta$  et VD est également observée lors de la régulation de CD14 pour lequel VD et TGF- $\beta$  agissent conjointement pour favoriser l'expression du gène dans la lignée cellulaire U-937, activation impliquant les C/EBPs (Pan *et al.* 1999). De plus, VD permet d'augmenter l'expression des récepteurs du TGF- $\beta$  de type 1 et 2 dans la lignée HL-60 tandis que ce phénomène n'est pas observé dans la lignée U-937, lignée n'exprimant pas NRAMP1 en réponse à la VD (Defacque *et al.* 1999; Cao *et al.* 2003). En plus de l'activation de la famille de facteurs de transcription Smad, la modification de l'activité transcriptionnelle de plusieurs gènes par Sp1 lors d'une stimulation par le TGF- $\beta$  est maintenant bien décrite (Botella *et al.* 2001; Jinnin *et al.* 2004; Law *et al.* 2004; Irvine *et al.* 2005). Ceci indique donc la possibilité d'une boucle d'activation entre la VD et le TGF- $\beta$ , boucle menant notamment à l'activation de Sp1 qui pourrait ainsi activer le



promoteur *NRAMP1*. Conséquemment, il serait intéressant de rechercher plus activement des éléments en *cis* permettant la liaison de membres de la famille de facteurs de transcription Smad et d'évaluer à l'aide d'anticorps neutralisants dirigés contre TGF- $\beta$ , ou par l'inhibition de l'expression du TGF- $\beta$  en utilisant des ARNi, pour ainsi démontrer l'importance de la stimulation autocrine par le TGF- $\beta$  par les cellules HL-60 en différenciation terminale induite par la VD tout comme c'est le cas avec l'acide rétinoïque (Falk *et al.* 1991; Turley *et al.* 1996).

### ***Expression de la protéine***

Bien que l'expression de l'ARNm de *NRAMP1* ait été décrite lors de la différenciation terminale de HL-60, l'expression de la protéine n'avait pas encore été confirmée. Nous avons donc démontré que l'expression de *NRAMP1* lors de la différenciation induite par la VD corrélait avec l'expression de NRAMP1 dans notre modèle cellulaire (article 1 Fig.4). De plus, tel que démontré précédemment avec des macrophages murins issus de la moelle osseuse avec des billes de latex (Gruenheid *et al.* 1997) ou dans la lignée murine RAW264.7 avec *S. typhimurium* et *Yersinia enterocolitica* (Govoni *et al.* 1999), nos travaux ont permis de montrer que la protéine est recrutée au phagosome de cellules humaines suite à la phagocytose en utilisant cette fois-ci HL-60 et *C albicans*.

Puisque la lignée HL-60 peut-être également différenciée en type granulocytaire nous avons également pu démontrer par microscopie traditionnelle et confocale l'expression de la protéine et sa relocalisation dans la membrane des phagosomes de granulocytes. Ces données sont en accord avec celles concernant l'expression du messageur qui avait été démontrée dans ce type cellulaire lors de la différenciation induite par le DMSO (Cellier *et al.* 1997). Les résultats obtenus, incluant la synthèse tardive du mRNA lors de la différenciation induite par le DMSO et la localisation de la protéine dans les granules tertiaires des granulocytes quiescents (Canonne-Hergaux *et al.* 2002), suggèrent que NRAMP1 joue un rôle dans l'arsenal antibactérien des granulocytes, qui représentent la principale source d'expression de l'ARNm dans le sang périphérique (Cellier *et al.* 1997). L'association de NRAMP1 avec la sous-unité  $\delta$  de l'ATPase vacuolaire dans les granules tertiaires indique également que le recrutement de la protéine au phagosome est

accompagné du recrutement de l'ATPase dont l'action d'acidification de la lumière du phagosome est essentielle à l'activité de NRAMP1 (article 2 Fig.4).

### ***Mécanisme d'action de la VD***

La différenciation de la lignée HL-60 induite par VD peut être divisée en deux phases; une première durant laquelle la division cellulaire se poursuit, puis une phase de maturation après l'arrêt de la division cellulaire en phase G1 (Wang *et al.* 1996). L'expression de l'ARNm du récepteur de haute affinité au LPS (*CD14*) est induite dès les premières heures de différenciation et cette expression correspond à l'expression du récepteur à la surface des cellules (article 1 Fig. 1). Cette expression associée aux événements précoces de différenciation est dépendante du VDR (Studzinski *et al.* 1997). De plus, cette expression précoce diffère de celle de *NRAMP1* qui n'est observée qu'à partir du deuxième jour de différenciation et qui augmente jusqu'au jour 5. L'expression plus tardive suggère donc soit que *NRAMP1* n'est pas sous le contrôle direct du VDR, soit que *NRAMP1* nécessite d'autres facteurs essentiels en plus du VDR pour être exprimé.

Puisque l'analyse du promoteur de *NRAMP1* n'a pas permis de détecter de site classique du VDR (voir section 1.5.4.1) (seul un site dégénéré est potentiellement présent en amont de la région identifiée par transfection transitoire) nous avons utilisé différents analogues structuraux de la VD pour cerner le rôle de la VD dans l'expression du gène. Les analogues génomiques EB et KH, plus puissants pour induire la différenciation monocyttaire, sont également plus actifs pour induire l'expression de *NRAMP1* d'un facteur 10 à 100 (article 1 Fig.3). La combinaison de VD avec le ligand du RAR n'a pas permis d'induire l'expression du messenger tandis que l'ajout d'une faible concentration de 9-*cis* RA, ligand du RXR favorise l'expression, indiquant un rôle possible d'un hétérodimère RXR-VDR dans l'activation transcriptionnelle. En dépit d'effets génomiques de VD via le VDR sur l'expression de *NRAMP1*, la contribution d'effets non-génomiques de VD reste possible (section 1.5.4.2).

Mais la contribution de cet effet de VD est-il direct ou plutôt une conséquence de la différenciation? Une analyse plus approfondie de la région essentielle pour l'expression

myéloïde et la réponse à la VD ne permet toujours pas l'identification d'un élément de liaison de VDR. Il a été démontré que le VDR peut interagir avec d'autres facteurs de transcription pour activer certains promoteurs qui ne possèdent pas de site de liaison de VDR, notamment avec Sp1 dans le cas du promoteur du gène *p27kip* (Huang *et al.* 2004). Cependant, l'absence d'effet du VDR en co-transfection dans les cellules 293 suggère que VD agit plutôt indirectement sur le promoteur (article 3 Fig.4) que ce soit en se liant à l'ADN ou à un autre facteur de transcription. Dans ce contexte, l'expression tardive du gène pourrait donc être indirectement associée au VDR, soit par l'activation d'autres facteurs de transcription tel HoxA-10 ou Mad1, soit par la sécrétion de cytokines agissant de manière autocrine, soit par un mécanisme global relié à la différenciation cellulaire (Rachez et Freedman 2000) (section 1.5.4.3).

### ***Fragment du promoteur conférant la spécificité myéloïde***

Pour cette étape nous avons établi des transfectants stables de la lignée cellulaire HL-60. L'utilisation de clones stables nous permet d'observer l'activation transcriptionnelle sans toutefois permettre de comparer l'activité basale du promoteur qui varie d'un clone à l'autre. Pour ce faire, nous devons nous reporter aux transfections transitoires pour lesquelles le fragment court était de 3 à 6 fois moins actif dans un contexte myéloïde (article 1 Fig.5). L'utilisation de clones stables fut toutefois préférée pour la suite du projet étant donné la très faible efficacité de transfection de la lignée cellulaire HL-60 et l'avantage apporté par les clones stables au niveau de la reproductibilité des résultats qui permet de détailler finement la réponse des constructions dans différentes conditions d'induction.

La délétion progressive de la région conférant la spécificité myéloïde permet de définir une région essentielle pour son activité située dans sa partie 5'. Cette région de 32pb est délimitée par les constructions 5E3 (-547pb par rapport à l'ATG) et 5E4 (-514pb par rapport à l'ATG). L'activation de la construction 5E4 lors de la différenciation induite par la VD est abolie (article 3, Fig.1). Des délétions supplémentaires jusqu'au fragment basal (SrS) permettent de retrouver un certain niveau d'activation qui correspond probablement à l'activité minimale du promoteur (article 3, Fig.1).

En plus de permettre l'activation transcriptionnelle en réponse à la VD, le fragment de 647pb du promoteur *NRAMP1* est également activé lors de la différenciation granulocytaire induite par la DMSO (article 3 Fig.3). Dans ce contexte, la différenciation myéloïde de la lignée cellulaire HL-60 avec le fragment du promoteur 5E4 indique également l'importance d'un site situé en amont de l'extrémité de 5E4.

Bien que la régulation du fragment L (clones HSRL, 647 pb en amont de l'ATG) de promoteur en réponse à VD corresponde à la régulation du gène endogène, il n'en va pas de même pour la stimulation avec l'IFN $\gamma$ . L'expression du messager n'est induite par l'IFN $\gamma$  que lorsqu'il est utilisé en combinaison avec VD, un traitement avec l'IFN $\gamma$  seul ne stimulant pas suffisamment pour activer l'expression du gène. Cependant, le fragment de promoteur qui contrôle l'expression de *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes est activé par l'IFN $\gamma$  seul, tandis que la combinaison VD et IFN $\gamma$  reproduit la potentialisation de l'activation du promoteur endogène (article 1, Fig.7). Ceci indique soit la présence d'éléments régulateurs négatifs du promoteur situé en dehors de la région de 647pb, soit une régulation épigénétique de l'activité du gène, régulation qui ferait partie du contexte génétique de l'endogène mais qui serait absente dans les transfectants stables. Puisque l'importance de Sp1 dans l'activation du promoteur *NRAMP1* a été établie, il est pertinent de noter que ce facteur de transcription interagit avec des histones acétylases, pouvant ainsi provoquer des modifications de l'état de la chromatine (Boekhoudt *et al.* 2003). De même, VDR interagit avec des protéines ayant une activité histone acétyl-transférase telles que des membres de la famille SRC/p160 et CBP/p300 (Rachez et Freedman 2000), et bien que nous n'ayons identifié aucun site de liaison du VDR dans la région myéloïde spécifique, il demeure possible que le VDR se lie à un site non conventionnel en amont ou en aval et augmente l'accessibilité du promoteur myéloïde en diminuant la condensation de la chromatine.

### ***Recherche des éléments cis contrôlant l'expression myéloïde***

Nous avons recherché les régions impliquées dans l'activation transcriptionnelle de la région de 647 pb par empreinte à la DNase. Cette approche fut choisie afin d'identifier

des sites en aval de l'extrémité du fragment 5E4 et de permettre de définir sans se baser sur des prédictions les régions liées par des facteurs nucléaires *in vitro*. Certaines différences ont été observées dans le patron de liaison entre les extraits cellulaires provenant de cellules Jurkat et ceux de cellules HL-60. Nous n'avons cependant pas observé de différences entre le patron obtenu entre les extraits de cellules différenciées et non-différenciées, suggérant que l'activation du promoteur pourrait être causée soit par une modification post-traductionnelle de l'activité de facteurs présents dans les cellules non-différenciées (voir section Sp1 plus bas) soit par la liaison différentielle de protéines liant la même séquence nucléotidique entre les extraits différenciés ou non (voir CDP1 et C/EBP plus bas), ou par le recrutement de co-activateurs (Huang *et al.* 2004).

Des 11 sites identifiés par empreinte à la DNase, la spécificité de la liaison a été confirmé pour 4: E2, E3, E6, E10 (article 3 Fig.2 et Fig. suppl. 2 et 3). Des mutations abolissant la liaison des facteurs de transcription ont été caractérisées par EMSA en mutant séquentiellement 6pb à la fois par région. L'importance des sites mutés pour E2M2, E6M2 et E10M0 a été confirmée par la perte de l'activation myéloïde avec des transfectants stables pour chacun de ces sites (article 3 Fig.3). L'importance du site E3M2 reste à confirmer en établissant des transfectants stables contenant cette mutation, bien que l'importance de la région E3 située juste en amont de la délétion 5E4 soit déjà démontrée par la perte totale d'activation du promoteur *NRAMP1*. Nous pouvons donc considérer à cette étape que l'activation myéloïde du gène *NRAMP1* repose minimalement sur 4 éléments *cis*, soit les sites E2M2, E6M2, E10M0 et la région E3.

### ***Caractérisation des sites conférant la spécificité myéloïde***

#### **E10**

La protection contre la DNase pour le site E10 a été observée préférentiellement avec les extraits cellulaires de cellules HL-60 par rapport à ceux de cellules Jurkat (article 3 Fig.2A, bas de la protection). La liaison d'un facteur spécifique a été démontrée par la compétition avec la sonde native froide et par l'absence de compétition résultant de la mutation E10M0. Le site E10 est probablement lié par Sp1 *in vitro* puisqu'un excès de 5X

d'un ODNdb possédant un site consensus pour Sp1 est suffisant pour déplacer le facteur lié à E10 et abroger le retard sur gel (article 3 Fig.2D) et le complexe est déplacé par un anticorps anti-Sp1 tandis qu'un contrôle d'anticorps non-spécifiques n'affecte pas le déplacement. De plus, les résultats de co-transfection dans les cellules 293 indiquent qu'une surexpression de Sp1 stimule l'activité de fragments du promoteur contenant le site E10. Une stimulation plus faible est également détectée avec Sp3. Sp1 et Sp3, qui sont exprimés de manière ubiquitaire, peuvent réguler des gènes myéloïdes et peuvent lier la même séquence. Cependant, Sp3 peut agir soit comme répresseur, soit comme faible activateur dépendamment du contexte (Resendes et Rosmarin 2004). Dans les cellules 293T, Sp3 est un activateur plus faible que Sp1 pour le promoteur de *NRAMP1*.

L'association de Sp1 avec E10 a été confirmée *in vitro* par « super retard sur gel » (supershift) en utilisant un anticorps anti-Sp1 (article 3 Fig.2D) en présence d'extraits nucléaires de cellules HL-60. L'importance de la mutation E10M0 (6 pb) pour l'activation du promoteur *in vivo* suggère fortement un rôle essentiel de Sp1 dans la régulation du promoteur *NRAMP1*, contrairement à d'autres promoteurs myéloïdes comme ceux des gènes *PU.1* et de *Blk*, où Sp1 participe à l'expression sans être essentiel (Muller *et al.* 1999). Le VDR peut également s'associer directement à Sp1 pour réguler le gène de la  $\beta$ -défensine (Chen *et al.* 2004) et celui de  $p27^{kip}$  (Huang *et al.* 2004). Bien que ce dernier mécanisme soit potentiellement pertinent pour l'expression du gène *NRAMP1*, la co-transfection du VDR avec Sp1 n'a pas permis de démontrer une synergie entre les deux facteurs, ce qui n'exclut pas qu'il puisse y avoir un site de liaison du VDR qui soit impliqué en amont ou en aval.

## E6

La protection à la DNase pour la région E6 est la plus efficace de toutes celles observées; il y a protection totale d'une région couvrant 17pb. La spécificité de la liaison a été établie par compétition avec un excès d'ODNds natif tandis que l'ODNds E6M2 ayant 6 pb mutées au coeur de la région protégée ne déplace plus la sonde native (article 3 Fig. 2E). Tout comme dans le cas de la mutation E10M0, l'absence d'activation observée avec les transfectants possédant la mutation E6M2 démontre l'importance du site protégé *in*

*in vitro* pour l'activation transcriptionnelle du promoteur *in vivo* en réponse à la différenciation induite par VD et DMSO (article 3 Fig. 3).

Il est possible que le facteur Sp1 interagisse avec le fragment E6, l'association étant cependant moins évidente que pour le fragment E10. L'utilisation d'un excès de 50x de l'ODNdb contenant la séquence consensus liant Sp1 déplace légèrement la sonde marquée par rapport au fragment E6. Cette compétition n'a pas été observée avec l'ODNdb correspondant à la séquence consensus avec 2 pb mutées (article 3 Fig.2E) et l'ajout d'Ac anti-Sp1 concentré a faiblement diminué l'intensité du retard sur gel avec le fragment E6. Cette diminution n'est pas accompagnée de la formation d'un complexe migrant plus lentement sur gel, quoi que cela soit fréquent dans ce genre d'expériences (Carey et Smale 2000). Encore une fois, Sp1 est un candidat plus probable que Sp3 puisque ce dernier ne permet pas les interactions entre plusieurs sites de liaison Sp, et peut alors inhiber la transcription de Sp1 (Yu *et al.* 2003; Li *et al.* 2004). Une autre indication suggérant un rôle pour Sp1, bien qu'indirecte, est la compétition très efficace et spécifique du fragment E6 par le fragment E10. Puisque un rôle positif de Sp1 ne permet pas d'expliquer à lui seul le retard du fragment E6, nous avons entrepris la recherche d'autres facteurs de transcription pouvant interagir avec Sp1.

Le facteur MEF est un autre candidat potentiellement impliqué dans cette interaction. Des membres de la famille ETS sont fréquemment associés avec Sp1 dans la régulation de gènes myéloïdes. C'est notamment le cas pour GABP dans le cas de *CD18* (Rosmarin *et al.* 1998), PU.1 dans le cas du gène de l'élastase du neutrophile (Nuchprayoon *et al.* 1999) et pour MEF (Myeloid Elf-1 like factor) qui est impliqué dans la transcription de gènes de l'immunité innée dont la  $\beta$ -défensine (Suico *et al.* 2004) et le lysosime (Inoue *et al.* 1999). MEF agit de concert avec Sp1 pour activer la transcription du gène codant pour le lysozyme (Suico *et al.* 2004) et son activité est restreinte à la phase G1 de division cellulaire (Miyazaki *et al.* 2001), phase d'arrêt des cellules HL-60 lors de la différenciation. D'autres facteurs de transcription de la famille ETS, tel que Elf-1, peuvent cependant lier le même site que MEF (Miyazaki *et al.* 1996) et puisque nous avons pour l'instant qu'une compétition en EMSA, il faudra confirmer l'implication de MEF ou d'un facteur associé par une approche *in vivo*, notamment par co-transfection de

notre système rapporteur avec un plasmide exprimant le facteur de transcription ou par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Le site E6M2 est juxtaposé au polymorphisme de longueur de répétition CA (CA repeat), un type de structure pouvant causer une inversion de l'orientation de la double hélice (left-handed DNA) (Rich et Zhang 2003). La région de ce polymorphisme est associée à la susceptibilité aux infections mycobactériennes et une étude a suggéré que les différents allèles conditionnent une activité transcriptionnelle variable (Searle et Blackwell 1999). Une mutation spontanée lors de la production de la construction E6M2 a résulté en un allèle différent de celui d'origine qui correspond à l'allèle 3, le plus répandu et le plus fortement exprimé (Searle et Blackwell 1999) (les clones d'origine étant affectés; nous avons produits de nouveaux clones, dont E6M2AC, pour confirmer nos résultats). Les transfectants stables pour ces deux allèles répondent de manière équivalente à la VD, réponse cependant diminuée par l'effet de la mutation E6M2, sans nous permettre toutefois d'analyser une modification potentielle de leur niveau de base.

## **E2**

La mutation E2M2 ne permet pas d'inhiber totalement la liaison du facteur nucléaire liant l'ODNdb E2; cependant la compétition observée avec un excès de sonde froide E2 est relativement plus forte (Fig. suppl.2). Pour confirmer l'implication du site E2M2, un ODNdb chevauchant la sonde E2 au niveau de la mutation E2M2 (E2.2) a été utilisé comme sonde. Un excès de l'ODNdb E2 déplace le facteur liant le fragment E2.2 contrairement à l'ODNdb contenant la mutation E2M2 tandis que la mutation E2M1 située en amont de la région chevauchante n'empêche pas la compétition. Finalement l'introduction de la mutation E2M2 dans le promoteur diminue son activation en réponse à la différenciation myéloïde. Des analyses de la séquence du gène *NRAMP1* avec les logiciels de prédiction de sites de liaison de facteurs de transcription (Alibaba2, Match, MatInspector, SignalScan) indiquent la forte possibilité d'éléments de réponse à l'IFN $\gamma$ . Malgré le rôle des différents éléments de réponse de l'IFN $\gamma$  (Taniguchi *et al.* 2001), nous n'avons pu déplacer les facteurs liant le promoteur *NRAMP1* avec des ODN consensus pour les IRF (O'Reilly *et al.* 2003), STAT ou correspondant au GAS. Étant donné



l'importance de l'IFN $\gamma$  dans la réponse aux infections et la réponse obtenue en réponse à l'IFN $\gamma$  avec le clone HSRL5, une attention plus poussée devra être portée à identifier les éléments de réponse à l'IFN $\gamma$  dans le promoteur *NRAMP1*.

### **E3**

Aux trois régions E2, E6 et E10 qui sont essentielles à l'expression myéloïde de *NRAMP1*, on doit ajouter la contribution d'une autre région du promoteur. En effet, les clones stables ayant la construction du promoteur tronquée au début de la région E3 gardent un niveau d'activation élevé en réponse au KH tandis que les clones contenant un fragment plus court (E4) montrent une absence d'activation transcriptionnelle en réponse au KH et au DMSO. Suite à ces résultats, une plus grande attention fut portée à la région de 32 pb située entre les deux constructions et qui correspond au fragment E3. Ce fragment démontre un retard sur gel d'intensité relativement faible mais qui est spécifique et pour lequel une mutation (E3M2) qui ne permet plus de déplacer le facteur liant le site E3 a pu être définie (Fig. suppl.3).

L'analyse du site prédit la liaison du facteur de transcription NF-1. Le dérèglement de ce dernier fut initialement impliqué dans des « malignant myeloid disorder », puisque ce facteur participe normalement à l'arrêt de la prolifération cellulaire (Kalra *et al.* 1994). Le gène du lysosime du poulet est parmi les gènes associés à l'immunité innée qui sont régulés par NF-1 (Lefevre *et al.* 2003). La confirmation *in vivo* de l'importance de ce site de même que l'implication potentielle de NF-1 permettra de compléter l'analyse des régions importantes pour la transcription de *NRAMP1* dans les cellules myéloïdes.

La caractérisation des sites de liaison se base sur des mutations de 6pb. Ce nombre de paires de bases fut choisi pour cribler rapidement les régions définies par empreintes à la DNase tout en permettant de garder intactes (ou faiblement affectées) les capacités de liaison des ODNdb lorsque les mutations sont adjacentes au site de liaison. Pour les régions de 6pb définies comme site de liaison, le site muté pourra être étudié en deux parties afin d'affiner la localisation du site de liaison. D'autres mutations des demi-sites

impliqués pourraient permettre à terme de définir avec précision les bases essentielles à la liaison des facteurs myéloïdes liant les sites identifiés.

### ***Région basale de transcription du gène *NRAMP1****

La région gouvernant la transcription basale du gène *NRAMP1* a été définie par son activité en transfection transitoire et stable. Cette activité est indépendante du type cellulaire testé et de la présence ou non d'inducteurs. De plus, cette région contient les sites d'initiation de la transcription du gène.

Bien que l'expression d'aucun des six membres de la famille C/EBP ne soit restreinte aux granulocytes ou macrophages (seul C/EBP $\epsilon$  est limité aux cellules hématopoïétiques (Gombart et Koeffler 2002)), cette famille joue toutefois un rôle important dans les processus de différenciation terminale en général et dans la régulation de l'expression de gènes myéloïdes (Rosmarin *et al.* 2005). Les 3 membres de cette famille testés en co-transfection (C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ) permettent tous d'activer le promoteur basal de *NRAMP1*. Il est également notable qu'en présence d'un fragment du promoteur contenant les régions myéloïdes et basales, C/EBP  $\alpha$  et  $\beta$  peuvent interagir avec Sp1 pour stimuler la transcription tandis que C/EBP  $\epsilon$  semble également pouvoir interagir avec Sp1 mais plutôt pour inhiber la transcription dans la lignée 293T. Ce résultat permet de confirmer l'organisation en deux parties du promoteur *NRAMP1*. L'implication des C/EBP reste cependant à confirmer dans des cellules myéloïdes puisque les membres de la famille C/EBP forment soit des hétérodimères, soit des homodimères, possédant des activités de transactivation différentes (Landschulz *et al.* 1989; Rosmarin *et al.* 2005).

Le facteur C/EBP $\alpha$  est essentiel au développement des cellules myéloïdes. Son expression est augmentée lors du développement des cellules granulocytaires et diminuée lors du développement des macrophages (Radomska *et al.* 1998), tandis que C/EBP $\epsilon$  est exprimé plus fortement dans les granulocytes en différenciation terminale (Gery *et al.* 2004). À l'opposé, C/EBP $\beta$  est essentiel à la différenciation de la lignée cellulaire de la lignée HL-60 induite par la VD (Ji et Studzinski 2004) et est impliqué dans l'activation

par la VD de l'hormone dégradant la VD produite par le rein et les ostéoblastes, la 25-hydroxyvitamine D(3) 24-hydrolase (Dhawan P Centrella M 2005). Les membres de la famille C/EBP peuvent lier le même site en *cis*, ce qui permet une certaine plasticité des facteurs pouvant être impliqués en *trans*. Il reste donc à définir quel(s) membre(s) de la famille pourraient être impliqués dans l'expression monocytaire et/ou granulocytaire du gène *NRAMP1* et vérifier s'ils contribuent à la transcription basale *in vivo*.

En plus des C/EBPs, CDP1 est également apparue en mesure de réguler l'activité du promoteur basal de *NRAMP1 in vitro*. Bien que pour certains promoteurs CDP1 peut agir en tant qu'activateur (Truscott *et al.* 2003), il agit pour *NRAMP1* en tant que répresseur dans les cellules 293T, ce qui semble conforme à son rôle connu dans l'expression de gènes lors de la différenciation myéloïde (Friedman 2002). L'activation du promoteur observée avec la fragment c-terminal p110 de CDP1 (aa 878-1505) (Moon *et al.* 2001) correspondant au fragment clivé par la cathepsine L (Goulet *et al.* 2004) démontre la capacité de la p110 de se lier et d'activer le promoteur bien que la présence de la forme clivée de la CDP1 ne soit pas démontrée dans les cellules HL-60. L'activité de CDP1 p200 décroît avec la progression de la différenciation myéloïde (Martin-Soudant *et al.* 2000; Bjerregaard *et al.* 2003) ce qui suggère que, si CDP1 agit bel et bien en tant que répresseur de l'activité du promoteur de *NRAMP1 in vivo*, la répression de la CDP1 pourrait diminuer avec la différenciation myéloïde de HL-60. Dans notre modèle, CDP1 inhiberait donc l'expression des gènes cibles dans les cellules progressant dans le cycle de division cellulaire, mais ne pourrait plus exercer son effet négatif dans les cellules en différenciation terminale qui sont arrêtées en phase G1 du cycle de division cellulaire. D'ailleurs, l'analyse des variations d'activité de familles de facteurs de transcription au cours de la différenciation de HL-60 induite par KH et l'IFN $\gamma$  a démontré une baisse de l'activité de liaison de CDP1 et une augmentation de la liaison du VDR et de C/EBP (Fig. suppl.4).

L'importance *in vivo* de CDP1 dans un contexte infectieux a été décrit lors de l'infection du modèle cellulaire HL-60 par *Anaplasma phagocytophilum* qui entraîne notamment une liaison accrue du facteur de transcription CDP1 au promoteur du gène gp91phox (Thomas *et al.* 2005). Il sera donc important de vérifier le rôle possible de CDP1 dans la régulation

myéloïde du gène *NRAMP1* et de déterminer son influence sur les capacités antimicrobiennes de l'hôte.

### ***Conservation de la régulation de l'expression des gènes humain et murin***

Les deux régions du promoteur humain définies selon leur rôle dans la transcription correspondent également à des segments du promoteur bien conservés chez les mammifères (Fig. suppl.5). Un bloc hautement conservé correspond à la portion de la région basale en amont des sites d'initiation tandis que la conservation est moindre en amont du site E6M2. Cette région du promoteur murin est régulée de manière négative par c-Myc tandis que Miz et Sp1 participent à son activation. Cette régulation est cependant différente de celle que nous observons avec le promoteur humain dont la région basale est régulée *in vitro* par CDP1 et C/EBP tandis que l'implication de Sp1 est restreinte à la région myéloïde spécifique.

Le promoteur murin *Nramp1* ne contient pas de boîte TATA, mais plutôt deux séquences initiatrices (Inr). Il a été montré que c-Myc en se liant à une séquence Inr bloque l'activité basale du promoteur en recrutant le facteur p300/CBP alors que le facteur Miz-1 stimule la transcription en interagissant avec c-Myc (Bowen *et al.* 2002; Bowen *et al.* 2003). Une boîte enhancer (E) non canonique est requise pour l'activation due à Miz-1, qui peut se fixer également sur un élément Inr. Une boîte GC représentant un site consensus pour Sp1 est nécessaire pour l'activation par Miz-1 (Bowen *et al.* 2003). Il est également proposé que Sp1 puisse moduler l'expression de *Nramp1* en réponse au stress oxydatif (Yeung *et al.* 2004). Finalement, IRF-8 pourrait également contrôler l'expression du promoteur murin en coopération avec Pu.1 (Alter-Koltunoff *et al.* 2003). Par contre, la boîte E murine est située en amont de la région qui confère l'activation transcriptionnelle myéloïde du promoteur humain pour lequel un fragment additionnel de 3 kb n'augmente pas l'activité transcriptionnelle ou la réponse myéloïde (article 1 Fig.5).

La faible conservation du promoteur du gène *NRAMP1* au niveau des sites identifiés *in cis* (E2M2, E3M1, E6M2, E10M0 et E14M1) concorde avec la faible conservation apparente des mécanismes de régulation du promoteur humain et murin. Il sera toutefois

intéressant de déterminer si les bases conservées dans ces sites correspondent aux bases liées par des facteurs de transcriptions. Cette faible conservation des éléments en *cis* contraste avec la conservation plus forte observée en amont des sites d'initiation de la transcription, conservation pouvant indiquer l'importance et la moindre flexibilité des éléments responsables de l'initiation de la transcription comparativement aux mécanismes contrôlant l'expression myéloïde du gène. Certains sites protégés lors d'empreintes à la DNase sont identifiés dans cette région conservée et devront être étudiés afin de mieux définir les éléments responsables de l'assemblage du complexe basal de transcription.

### ***Spécificité de la régulation myéloïde de NRAMP1***

La régulation de l'activité du promoteur de *NRAMP1* est tributaire de mécanismes communs à la régulation génique lors de la différenciation myéloïde. Sp1 ressort comme facteur essentiel afin de conférer la spécificité myéloïde (section 1.5.5.2.1) (Resendes et Rosmarin 2004), notamment en réponse à la VD (*CD14*) ou à l'ATRA (*CD18*). Le site Sp1 du promoteur *NRAMP1* présent dans le fragment E10 et le site potentiel Sp1 sur le fragment E6 diffèrent toutefois du site Sp1 canonique (article 3 Fig.6 et Transfact Matrix Table release 6.0, AC M00008, [www.gene-regulation.com](http://www.gene-regulation.com)). La famille des C/EBPs, essentielle à l'activité basale du promoteur (article 3 Fig.5), est également importante pour l'expression de plusieurs gènes exprimés dans les cellules myéloïdes, dont *CD14* ou la lactoferrine (table 1 section 1.5.5.2.2). Finalement, un site consensus MEF permet de compétitionner la liaison au fragment E6 *in vitro* (article 3 Fig.2), suggérant l'implication d'un membre de la famille ETS dans le contrôle de *NRAMP1*.

Bien que Sp1 et la famille C/EBP soient impliqués dans la réponse à la VD tant du promoteur de *NRAMP1* que de celui de *CD14*, *NRAMP1* et *CD14* restent cependant distinctes tant au niveau de leur cinétique d'expression (article 1 Fig.1) qu'au niveau de la spécificité tissulaire d'expression en réponse à différents stimuli (Cellier *et al.* 1997). De plus, contrairement au promoteur de *CD18*, aucun site de liaison du RAR (RARE) n'est détecté par analyse de séquence et le gène n'est pas exprimé lors de la différenciation de HL-60 induite par l'ATRA (Cellier *et al.* 1997). Tout comme pour le RARE, aucun site de liaison du VDR n'est détecté dans le promoteur de *NRAMP1*, l'ajout d'un fragment de

3 kb en amont du fragment conférant la spécificité myéloïde (L ou -647) ne permet pas d'augmenter l'activation en réponse à la VD (article 1 Fig.5), et il n'y a pas de réponse du promoteur à la co-transfection du VDR dans les cellules 293 (article 3 Fig.4). La CDP1 inhibe *in vitro* l'effet activateur de Sp1 (article 3 fig 4), comme l'activité de CDP1 décroît avec la différenciation terminale des cellules HL-60 (Bjerregaard *et al.* 2003) (section 1.5.5.2.5) il sera intéressant de voir si ce facteur de transcription participe à la régulation tardive de l'expression *in vivo*.

Le promoteur du gène *NRAMP1* humain diffère donc du promoteur *Nramp1* murin en ce qui a trait aux éléments *trans* et *cis* malgré un patron d'expression tissulaire conservé entre les deux homologues. De plus, il diffère de ceux d'autres gènes myéloïde humains en ce qui concerne le stade de différenciation et le type de différenciation myéloïde permettant l'expression et ce malgré l'utilisation de facteur de transcription communs. Ceci démontre donc l'importance d'étudier et de définir les sites actifs en *cis* pour les promoteurs de gènes associés aux maladies humaines, comme pour *NRAMP1* et la tuberculose (Greenwood *et al.* 2000). Cette connaissance permettra à terme de lier les polymorphismes génétiques potentiellement fonctionnels, en particulier des SNPs, avec une région régulatrice active. Ce type d'information permet de maximiser l'impact de projets comme le projet international HapMap qui a pour but de caractériser des polymorphismes génétiques affectant la susceptibilité aux maladies humaines et la variabilité de l'efficacité de traitements ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)).

### ***Analyse globale des facteurs de transcription***

Une analyse globale comparative de l'activité des facteurs nucléaires présents dans les cellules HL-60 différenciées et non différenciées nous permet de noter la diminution de l'expression du facteur CDP1, conformément à ce qui est décrit lors de la différenciation myéloïde (Martin-Soudant *et al.* 2000), et une augmentation de VDR et de C/EBP ce qui conforte l'importance que ces facteurs exercent *in vivo* dans la lignée cellulaire HL-60. L'augmentation de l'activité de liaison observée pour les C/EBP n'est pas très importante, mais représente toutefois la modification globale de l'activité de liaison des membres de la famille, le site de liaison n'étant pas spécifique. Il peut donc y avoir une augmentation

plus marquée de l'activité d'un membre de la famille qui n'est pas détectée puisque cette augmentation peut être compensée par la diminution de l'activité d'un autre membre.

Cependant, dans le cas de Sp1 qui joue un rôle important dans l'activation transcriptionnelle de *NRAMP1*, nous n'avons pas détecté de modification de son activité par cette technique. Il apparaît donc possible que le rôle de Sp1 dans la régulation myéloïde de l'expression de *NRAMP1* s'explique par le biais d'interactions avec d'autres facteurs dont l'activité est régulée au cours de la différenciation myéloïde. Une telle interaction est observée avec C/EBP dans un contexte de défense de l'hôte lié à la régulation de l'accessibilité au fer (Khanna-Gupta *et al.* 2000). Il est également possible que l'activité de Sp1 soit modulée lors de la différenciation myéloïde par des modifications post-traductionnelles; notamment par le clivage de Sp1 par la myéloblastine dans les cellules HL-60 non-différenciées, ce qui permet à Sp1 clivé de conserver son activité de liaison à l'ADN, mais pas ses capacités transactivatrices (Rao *et al.* 1998). Dans ce contexte, la liaison *in vitro* de la protéine ne peut révéler à elle seule l'importance de cette dernière *in vivo*.

### ***Évaluation directe des facteurs in vivo***

Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *NRAMP1* expliquent le peu de différences observées dans les empreintes et les retards sur gels obtenus avec les extraits nucléaires provenant de cellules différenciées ou non. Cette faible spécificité apparente est en effet fort probablement causée par la liaison aux éléments *cis* de protéines dont l'activité (CDP1, C/EBP) ou l'identité (C/EBP) peut être modifiée lors de la différenciation ou dont l'activité peut être modulée par des modifications post-traductionnelles (Sp1). La compétition *in vivo* avec des oligonucléotides suggère déjà fortement l'implication de Sp1 lors de la différenciation myéloïde dans l'activité du promoteur *NRAMP1* (article 3 Fig.5). Néanmoins l'étude des facteurs associés *in vivo* par ChIP (chromatin immunoprecipitation) sera nécessaire pour confirmer l'association des facteurs *trans* et des éléments *cis* identifiés dans cette étude lors de la différenciation myéloïde. Cette approche permettra également de confirmer les résultats obtenus avec la lignée cellulaire HL-60 en utilisant des cellules primaires; PMN,

monocytes, macrophages dérivés de monocytes. Finalement, cette même approche pourra permettre de confirmer ou d'infirmier la possibilité d'une interaction directe du VDR avec le promoteur ou une autre partie du gène *NRAMP1*.



## Chapitre 7 : Conclusions

Durant cette étude nous avons caractérisé le promoteur proximal du gène *NRAMP1*. Nous avons démontré la présence de plusieurs sites d'initiation de la transcription dans le modèle cellulaire HL-60, caractéristique partagée par plusieurs promoteurs myéloïdes. Le promoteur proximal situé en amont de ces sites peut être divisé en deux régions; l'une dirige la transcription basale tandis que la partie en amont du promoteur proximal permet la régulation myéloïde notamment en réponse à la VD et au DMSO. Dans cette dernière région, 4 éléments *cis* nécessaires pour conférer la régulation myéloïde ont été définis. Sp1 constitue un facteur *trans* crucial pour cette régulation myéloïde en liant certains éléments en *cis*. D'autres partenaires possibles pouvant interagir avec Sp1 pour assurer le contrôle de l'expression dans des cellules myéloïdes matures ont également été définis; C/EBP et CDP1 dans la région basale et MEF en amont.

Une conservation limitée tant entre les séquences régulatrices en *cis* que les mécanismes agissant en *trans* est observée entre les orthologues humain et murin de *NRAMP1* bien qu'ils soient tous deux exprimés dans les mêmes types cellulaires et régulés par l'interféron  $\gamma$ . Ceci démontre la pertinence de l'approche choisie pour l'étude du promoteur humain, approche qui ne se base pas sur des prédictions de régions potentiellement impliquées que ce soit par comparaison des orthologues ou par analyse *in silico*.

Sp1 ressort comme facteur critique pour le contrôle génique dans les cellules myéloïdes et le rôle pressenti de(s) membre(s) de la famille C/EBP représentent des caractéristiques importantes pour la spécificité d'expression des gènes dans la lignée hématopoïétique myéloïde. Nous pouvons donc conclure que l'essentiel des données désignent le promoteur *NRAMP1* comme modèle pour étudier les caractéristiques d'un promoteur spécifique du lignage myéloïde. Il sera maintenant intéressant de lier les polymorphismes génétiques dans les régions importantes en *cis* pour l'expression de *NRAMP1* avec la résistance naturelle de l'hôte aux infections afin d'en déterminer l'importance fonctionnelle.

## Bibliographie

- Abe, E., C. Miyaura, et al. (1981). "Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(8): 4990-4.
- Abel, L., F. O. Sanchez, et al. (1998). "Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene." *J Infect Dis* 177(1): 133-45.
- Adams, J. S., O. P. Sharma, et al. (1983). "Metabolism of 25-hydroxyvitamin D3 by cultured pulmonary alveolar macrophages in sarcoidosis." *J Clin Invest* 72(5): 1856-60.
- Adams, J. S., F. R. Singer, et al. (1985). "Isolation and structural identification of 1,25-dihydroxyvitamin D3 produced by cultured alveolar macrophages in sarcoidosis." *J Clin Endocrinol Metab* 60(5): 960-6.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." *Nature* 404(6774): 193-7.
- Albright, S. R. et R. Tjian (2000). "TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas." *Gene* 242(1-2): 1-13.
- Allavena, P., M. Chieppa, et al. (2004). "From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor." *Crit Rev Immunol* 24(3): 179-92.
- Allison, A. C. (1954). "Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection." *Br Med J* 4857: 290-4.
- Alter-Koltunoff, M., S. Ehrlich, et al. (2003). "Nramp1-mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRF-8, PU.1, and Miz-1." *J Biol Chem* 278(45): 44025-32.
- Altet, L., O. Francino, et al. (2002). "Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs." *Infect Immun* 70(6): 2763-71.
- Alvarez, M., S. J. Rhodes, et al. (2003). "Context-dependent transcription: all politics is local." *Gene* 313: 43-57.

- Anderson, D. J., F. H. Gage, et al. (2001). "Can stem cells cross lineage boundaries?" *Nat Med* 7(4): 393-5.
- Anderson, G. J., D. M. Frazer, et al. (2002). "The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption." *Blood Cells Mol Dis* 29(3): 367-75.
- Andrews, N. C. (2004). "Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link." *J Clin Invest* 113(9): 1251-3.
- Anes, E., M. P. Kuhnel, et al. (2003). "Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria." *Nat Cell Biol* 5(9): 793-802.
- Antonson, P., B. Stellan, et al. (1996). "A novel human CCAAT/enhancer binding protein gene, C/EBPepsilon, is expressed in cells of lymphoid and myeloid lineages and is localized on chromosome 14q11.2 close to the T-cell receptor alpha/delta locus." *Genomics* 35(1): 30-8.
- Aritomi, M., N. Kunishima, et al. (1999). "Atomic structure of the GCSF-receptor complex showing a new cytokine-receptor recognition scheme." *Nature* 401(6754): 713-7.
- Armstrong, J. A. et P. D. Hart (1975). "Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival." *J Exp Med* 142(1): 1-16.
- Atkinson, P. G. et C. H. Barton (1998). "Ectopic expression of Nramp1 in COS-1 cells modulates iron accumulation." *FEBS Lett* 425(2): 239-42.
- Atkinson, P. G. et C. H. Barton (1999). "High level expression of Nramp1G169 in RAW264.7 cell transfectants: analysis of intracellular iron transport." *Immunology* 96(4): 656-62.
- Baran, D. T., J. M. Quail, et al. (2000). "Annexin II is the membrane receptor that mediates the rapid actions of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)." *J Cell Biochem* 78(1): 34-46.
- Barnes, P. F., R. L. Modlin, et al. (1989). "Transpleural gradient of 1,25-dihydroxyvitamin D in tuberculous pleuritis." *J Clin Invest* 83(5): 1527-32.
- Barreda, D. R., P. C. Hanington, et al. (2004). "Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors." *Dev Comp Immunol* 28(5): 509-54.

- Beaumont, C., J. Protais, et al. (2003). "Effect of two candidate genes on the Salmonella carrier state in fowl." *Poult Sci* 82(5): 721-6.
- Beharka, A. A., C. D. Gaynor, et al. (2002). "Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages." *J Immunol* 169(7): 3565-73.
- Behr, M. A. et P. M. Small (1999). "A historical and molecular phylogeny of BCG strains." *Vaccine* 17(7-8): 915-22.
- Bellamy, R., N. Beyers, et al. (2000). "Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8005-9.
- Bellamy, R., C. Ruwende, et al. (1999). "Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene." *J Infect Dis* 179(3): 721-4.
- Bellamy, R., C. Ruwende, et al. (1998). "Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans." *N Engl J Med* 338(10): 640-4.
- Beltan, E., L. Horgen, et al. (2000). "Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria." *Microb Pathog* 28(5): 313-8.
- Ben-Ali, M., M. R. Barbouche, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 Arg677Trp polymorphism is associated with susceptibility to tuberculosis in Tunisian patients." *Clin Diagn Lab Immunol* 11(3): 625-6.
- Bjerregaard, M. D., J. Jurlander, et al. (2003). "The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow." *Blood* 101(11): 4322-32.
- Blackwell, J. M., S. Toole, et al. (1988). "Analysis of Lsh gene expression in congenic B10.L-Lshr mice." *Curr Top Microbiol Immunol* 137: 301-9.
- Bloom, B. R. et C. J. Murray (1992). "Tuberculosis: commentary on a reemergent killer." *Science* 257(5073): 1055-64.
- Boekhoudt, G. H., Z. Guo, et al. (2003). "Communication between NF-kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene." *J Immunol* 170(8): 4139-47.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the regulation of gene expression." *Trends Cell Biol* 11(2): 66-75.

- Bolzer, A., G. Kreth, et al. (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." *PLoS Biol* 3(5): e157.
- Borelli, V., F. Vita, et al. (2002). "Ultrastructure of the interaction between mycobacterium tuberculosis- H37Rv-containing phagosomes and the lysosomal compartment in human alveolar macrophages." *Exp Mol Pathol* 73(2): 128-34.
- Bornman, L., S. J. Campbell, et al. (2004). "Vitamin d receptor polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in west Africa: a case-control and family study." *J Infect Dis* 190(9): 1631-41.
- Borregaard, N. et J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." *Blood* 89(10): 3503-21.
- Bot, F. J., L. van Eijk, et al. (1989). "Interleukin-6 synergizes with M-CSF in the formation of macrophage colonies from purified human marrow progenitor cells." *Blood* 73(2): 435-7.
- Botella, L. M., T. Sanchez-Elsner, et al. (2001). "Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation." *J Biol Chem* 276(37): 34486-94.
- Bouillon, R., M. Garmyn, et al. (1995). "Paracrine role for calcitriol in the immune system and skin creates new therapeutic possibilities for vitamin D analogs." *Eur J Endocrinol* 133(1): 7-16.
- Bouley, D. M., N. Ghorri, et al. (2001). "Dynamic nature of host-pathogen interactions in *Mycobacterium marinum* granulomas." *Infect Immun* 69(12): 7820-31.
- Bowen, H., T. E. Biggs, et al. (2002). "c-Myc represses and Miz-1 activates the murine natural resistance-associated protein 1 promoter." *J Biol Chem* 277(38): 34997-5006.
- Bowen, H., A. Lapham, et al. (2003). "Characterization of the murine Nramp1 promoter: requirements for transactivation by Miz-1." *J Biol Chem* 278(38): 36017-26.
- Bradley, D. J. (1974). "Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*." *Nature* 250(464): 353-4.
- Brandenburg, K., G. Jurgens, et al. (2001). "Biophysical characterization of lipopolysaccharide and lipid A inactivation by lactoferrin." *Biol Chem* 382(8): 1215-25.

- Breitman, T. R., S. E. Selonick, et al. (1980). "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(5): 2936-40.
- Brewer, T. F. et S. J. Heymann (2004). "To control and beyond: moving towards eliminating the global tuberculosis threat." *J Epidemiol Community Health* 58(10): 822-5.
- Bridle, K. R., D. M. Frazer, et al. (2003). "Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homoeostasis." *Lancet* 361(9358): 669-73.
- Brown, A. J., A. Dusso, et al. (1999). "Vitamin D." *Am J Physiol* 277(2 Pt 2): F157-75.
- Burge, E. J., D. T. Gauthier, et al. (2004). "Mycobacterium-inducible Nramp in striped bass (*Morone saxatilis*)." *Infect Immun* 72(3): 1626-36.
- Burgess, A. W., J. Camakaris, et al. (1977). "Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium." *J Biol Chem* 252(6): 1998-2003.
- Buschman, E. et E. Skamene (2001). "From Bcg/Lsh/Ity to Nramp1: three decades of search and research." *Drug Metab Dispos* 29(4 Pt 2): 471-3.
- Buschman, E., T. Taniyama, et al. (1989). "Functional expression of the Bcg gene in macrophages." *Res Immunol* 140(8): 793-7.
- Bush, T. S., M. St Coeur, et al. (2003). "GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells." *Blood* 101(1): 311-7.
- Caldas, A. E., R. W. Gray, et al. (1978). "The simultaneous measurement of vitamin D metabolites in plasma: studies in healthy adults and in patients with calcium nephrolithiasis." *J Lab Clin Med* 91(5): 840-9.
- Camaschella, C., A. Roetto, et al. (2000). "The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22." *Nat Genet* 25(1): 14-5.
- Canonne-Hergaux, F., J. Calafat, et al. (2002). "Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules." *Blood* 100(1): 268-75.

- Canonne-Hergaux, F., S. Gruenheid, et al. (1999). "Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron." *Blood* 93(12): 4406-17.
- Cao, Z., K. C. Flanders, et al. (2003). "Levels of phospho-Smad2/3 are sensors of the interplay between effects of TGF-beta and retinoic acid on monocytic and granulocytic differentiation of HL-60 cells." *Blood* 101(2): 498-507.
- Carey, M. (1998). "The enhanceosome and transcriptional synergy." *Cell* 92(1): 5-8.
- Carey, M. et S. T. Smale (2000). *Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies and Techniques*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Casanova, J. L. et L. Abel (2002). "Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model." *Annu Rev Immunol* 20: 581-620.
- Casanova, J. L. et L. Abel (2004). "The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions." *Nat Rev Immunol* 4(1): 55-66.
- Cellier, M., G. Govoni, et al. (1994). "Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression." *J Exp Med* 180(5): 1741-52.
- Cellier, M., G. Prive, et al. (1995). "Nramp defines a family of membrane proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(22): 10089-93.
- Cellier, M., C. Shustik, et al. (1997). "Expression of the human NRAMP1 gene in professional primary phagocytes: studies in blood cells and in HL-60 promyelocytic leukemia." *J Leukoc Biol* 61(1): 96-105.
- Cellier, M. F., I. Bergevin, et al. (2001). "Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters." *Trends Genet* 17(7): 365-70.
- Cervino, A. C., S. Lakiss, et al. (2002). "Fine mapping of a putative tuberculosis-susceptibility locus on chromosome 15q11-13 in African families." *Hum Mol Genet* 11(14): 1599-603.
- Chan, J., K. Tanaka, et al. (1995). "Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* 63(2): 736-40.
- Chandra, G., P. Selvaraj, et al. (2004). "Effect of vitamin D3 on phagocytic potential of macrophages with live *Mycobacterium tuberculosis* and lymphoproliferative response in pulmonary tuberculosis." *J Clin Immunol* 24(3): 249-57.

- Chen, F., Q. Wang, et al. (2004). "Up-regulation of Egr1 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 contributes to increased expression of p35 activator of cyclin-dependent kinase 5 and consequent onset of the terminal phase of HL60 cell differentiation." *Cancer Res* 64(15): 5425-33.
- Chen, H. M., H. L. Pahl, et al. (1993). "The Sp1 transcription factor binds the CD11b promoter specifically in myeloid cells in vivo and is essential for myeloid-specific promoter activity." *J Biol Chem* 268(11): 8230-9.
- Cheng, Y., O. Zak, et al. (2004). "Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex." *Cell* 116(4): 565-76.
- Chua, J. et V. Deretic (2004). "Mycobacterium tuberculosis reprograms waves of phosphatidylinositol 3-phosphate on phagosomal organelles." *J Biol Chem* 279(35): 36982-92.
- Clemens, D. L. et M. A. Horwitz (1995). "Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited." *J Exp Med* 181(1): 257-70.
- Cohen, M. L. (2000). "Changing patterns of infectious disease." *Nature* 406(6797): 762-7.
- Collins, S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression." *Blood* 70(5): 1233-44.
- Collins, S. J., R. C. Gallo, et al. (1977). "Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture." *Nature* 270(5635): 347-9.
- Collins, S. J., F. W. Ruscetti, et al. (1978). "Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(5): 2458-62.
- Cooper, A. M., B. H. Segal, et al. (2000). "Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox<sup>-/-</sup>) mice." *Infect Immun* 68(3): 1231-4.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" *Trends Cell Biol* 13(2): 65-70.
- Corbett, E. L., C. J. Watt, et al. (2003). "The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic." *Arch Intern Med* 163(9): 1009-21.
- Cosma, C. L., D. R. Sherman, et al. (2003). "The secret lives of the pathogenic mycobacteria." *Annu Rev Microbiol* 57: 641-76.



- Cremer, T. et C. Cremer (2001). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." *Nat Rev Genet* 2(4): 292-301.
- Cuellar-Mata, P., N. Jabado, et al. (2002). "Nramp1 modifies the fusion of Salmonella typhimurium-containing vacuoles with cellular endomembranes in macrophages." *J Biol Chem* 277(3): 2258-65.
- Dahl, R., D. L. Ramirez-Bergeron, et al. (2002). "Spi-B can functionally replace PU.1 in myeloid but not lymphoid development." *Embo J* 21(9): 2220-30.
- Dahl, R. et M. C. Simon (2003). "The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation." *Blood Cells Mol Dis* 31(2): 229-33.
- Daniel, C. P., I. L. Ponting, et al. (1989). "Growth and development of haemopoietic cells: a deterministic process?" *Haematol Blood Transfus* 32: 172-7.
- De Voss, J. J., K. Rutter, et al. (2000). "The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1252-7.
- Defacque, H., D. Piquemal, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta1 is an autocrine mediator of U937 cell growth arrest and differentiation induced by vitamin D3 and retinoids." *J Cell Physiol* 178(1): 109-19.
- Denis, M., A. Forget, et al. (1988). "Pleiotropic effects of the Bcg gene. I. Antigen presentation in genetically susceptible and resistant congenic mouse strains." *J Immunol* 140(7): 2395-400.
- Denis, M., A. Forget, et al. (1988). "Pleiotropic effects of the Bcg gene: III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages." *Clin Exp Immunol* 73(3): 370-5.
- Dikstein, R., S. Ruppert, et al. (1996). "TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74." *Cell* 84(5): 781-90.
- DiPersio, J., P. Billing, et al. (1988). "Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor." *J Biol Chem* 263(4): 1834-41.
- Donovan, A., A. Brownlie, et al. (2000). "Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter." *Nature* 403(6771): 776-81.
- Duits, A. J., W. Dimjati, et al. (1992). "Synergism of interleukin 6 and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in induction of myeloid differentiation of human leukemic cell lines." *J Leukoc Biol* 51(3): 237-43.

- Dye, C., B. G. Williams, et al. (2002). "Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis." *Science* 295(5562): 2042-6.
- Dynan, W. S. et R. Tjian (1983). "Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II." *Cell* 32(3): 669-80.
- Dynan, W. S. et R. Tjian (1983). "The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter." *Cell* 35(1): 79-87.
- Ehrt, S., D. Schnappinger, et al. (2001). "Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase." *J Exp Med* 194(8): 1123-40.
- Eklund, E. A. et R. Kakar (1999). "Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression." *J Immunol* 163(11): 6095-105.
- Elias, L. et D. E. Van Epps (1988). "Early effects of G- and GM-CSF upon HL-60 proliferation and differentiation." *Leukemia* 2(11): 763-5.
- Elias, L., F. J. Wogenrich, et al. (1980). "Altered pattern of differentiation and proliferation of HL-60 promyelocytic leukemia cells in the presence of leucocyte conditioned medium." *Leuk Res* 4(3): 301-7.
- Espinal, M. A. (2003). "The global situation of MDR-TB." *Tuberculosis (Edinb)* 83(1-3): 44-51.
- Falk, L. A., F. De Benedetti, et al. (1991). "Induction of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), receptor expression and TGF-beta 1 protein production in retinoic acid-treated HL-60 cells: possible TGF-beta 1-mediated autocrine inhibition." *Blood* 77(6): 1248-55.
- Fang, F. C. (2004). "Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies." *Nat Rev Microbiol* 2(10): 820-32.
- Farer, L. S., A. M. Lowell, et al. (1979). "Extrapulmonary tuberculosis in the United States." *Am J Epidemiol* 109(2): 205-17.

- Fattorini, L., Y. Xiao, et al. (1994). "Induction of IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha, GM-CSF and G-CSF in human macrophages by smooth transparent and smooth opaque colonial variants of *Mycobacterium avium*." *J Med Microbiol* 40(2): 129-33.
- Feinberg, J., C. Fieschi, et al. (2004). "Bacillus Calmette Guerin triggers the IL-12/IFN-gamma axis by an IRAK-4- and NEMO-dependent, non-cognate interaction between monocytes, NK, and T lymphocytes." *Eur J Immunol* 34(11): 3276-3284.
- Feng, J., Y. Li, et al. (1996). "Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1) gene." *Genome Res* 6(10): 956-64.
- Ferrari, G., H. Langen, et al. (1999). "A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria." *Cell* 97(4): 435-47.
- Fitness, J., S. Floyd, et al. (2004). "Large-scale candidate gene study of tuberculosis susceptibility in the Karonga district of northern Malawi." *Am J Trop Med Hyg* 71(3): 341-9.
- Fleming, M. D., M. A. Romano, et al. (1998). "Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3): 1148-53.
- Fleming, M. D., C. C. Trenor, 3rd, et al. (1997). "Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene." *Nat Genet* 16(4): 383-6.
- Fleming, R. E., J. R. Ahmann, et al. (2002). "Targeted mutagenesis of the murine transferrin receptor-2 gene produces hemochromatosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10653-8.
- Flynn, J. L. et J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." *Annu Rev Immunol* 19: 93-129.
- Forbes, J. R. et P. Gros (2003). "Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane." *Blood* 102(5): 1884-92.
- Fratti, R. A., J. M. Backer, et al. (2001). "Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest." *J Cell Biol* 154(3): 631-44.
- Frehel, C., F. Canonne-Hergaux, et al. (2002). "Effect of Nramp1 on bacterial replication and on maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in bone marrow-derived mouse macrophages." *Cell Microbiol* 4(8): 541-56.

- Freiman, R. N., S. R. Albright, et al. (2001). "Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development." *Science* 293(5537): 2084-7.
- Friedman, A. D. (2002). "Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development." *Oncogene* 21(21): 3377-90.
- Friedman, A. D. (2002). "Transcriptional regulation of myelopoiesis." *Int J Hematol* 75(5): 466-72.
- Fry, C. J. et C. L. Peterson (2001). "Chromatin remodeling enzymes: who's on first?" *Curr Biol* 11(5): R185-97.
- GATDD (2004). PA-824 Demonstrates Promise in Murine Model, Global Alliance for Tuberculosis Drug Development. 2004.
- Gatfield, J. et J. Pieters (2000). "Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages." *Science* 288(5471): 1647-50.
- Gauzzi, M. C., C. Purificato, et al. (2005). "Suppressive Effect of 1{alpha},25-Dihydroxyvitamin D3 on Type I IFN-Mediated Monocyte Differentiation into Dendritic Cells: Impairment of Functional Activities and Chemotaxis." *J Immunol* 174(1): 270-276.
- Gearing, D. P., J. A. King, et al. (1989). "Expression cloning of a receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Embo J* 8(12): 3667-76.
- Gery, S., A. F. Gombart, et al. (2004). "C/EBPepsilon interacts with retinoblastoma and E2F1 during granulopoiesis." *Blood* 103(3): 828-35.
- Giannetti, A. M. et P. J. Bjorkman (2004). "HFE and transferrin directly compete for transferrin receptor in solution and at the cell surface." *J Biol Chem* 279(24): 25866-75.
- Girard-Santosuosso, O., F. Lantier, et al. (2002). "Heritability of susceptibility to *Salmonella enteritidis* infection in fowls and test of the role of the chromosome carrying the NRAMP1 gene." *Genet Sel Evol* 34(2): 211-9.
- Girard-Santosuosso, O., P. Menanteau, et al. (1998). "Variability in the resistance of four chicken lines to experimental intravenous infection with *Salmonella enteritidis* phage type 4." *Avian Dis* 42(3): 462-9.
- Gombart, A. F. et H. P. Koeffler (2002). "Neutrophil specific granule deficiency and mutations in the gene encoding transcription factor C/EBP(epsilon)." *Curr Opin Hematol* 9(1): 36-42.

- Gomes, M. S. et R. Appelberg (1998). "Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*." *Immunology* 95(2): 165-8.
- Goswami, T., A. Bhattacharjee, et al. (2001). "Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter." *Biochem J* 354(Pt 3): 511-9.
- Gottgens, B. (2004). "Transcriptional regulation of haematopoiesis." *Vox Sang* 87 Suppl1: 15-9.
- Goulet, B., A. Baruch, et al. (2004). "A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor." *Mol Cell* 14(2): 207-19.
- Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, et al. (1999). "Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7." *Infect Immun* 67(5): 2225-32.
- Govoni, G., S. Gauthier, et al. (1997). "Cell-specific and inducible Nramp1 gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo." *J Leukoc Biol* 62(2): 277-86.
- Govoni, G., S. Vidal, et al. (1996). "The Bcg/Ity/Lsh locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 allele." *Infect Immun* 64(8): 2923-9.
- Grande, A., M. Montanari, et al. (2002). "Physiological levels of 1alpha, 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors." *J Leukoc Biol* 71(4): 641-51.
- Greaves, D. R. et S. Gordon (2002). "Macrophage-specific gene expression: current paradigms and future challenges." *Int J Hematol* 76(1): 6-15.
- Greenwood, C. M., T. M. Fujiwara, et al. (2000). "Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family." *Am J Hum Genet* 67(2): 405-16.
- Griffin, M. D., W. H. Lutz, et al. (2000). "Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs." *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 701-8.
- Grondin, N. et C. Tisseyre (2002). "Le retour de la peste blanche". *Découverte*. Montréal, Radio-Canada. 2004.

- Gruenheid, S., M. Cellier, et al. (1995). "Identification and characterization of a second mouse Nramp gene." *Genomics* 25(2): 514-25.
- Gruenheid, S., E. Pinner, et al. (1997). "Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome." *J Exp Med* 185(4): 717-30.
- Grzybowski, S. et E. A. Allen (1999). "Tuberculosis: 2. History of the disease in Canada." *Cmaj* 160(7): 1025-8.
- Guilbert, L. J. et E. R. Stanley (1980). "Specific interaction of murine colony-stimulating factor with mononuclear phagocytic cells." *J Cell Biol* 85(1): 153-9.
- Guinn, K. M., M. J. Hickey, et al. (2004). "Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." *Mol Microbiol* 51(2): 359-70.
- Gunshin, H., B. Mackenzie, et al. (1997). "Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter." *Nature* 388(6641): 482-8.
- Hackam, D. J., O. D. Rotstein, et al. (1998). "Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification." *J Exp Med* 188(2): 351-64.
- Han, I. et J. E. Kudlow (1997). "Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility." *Mol Cell Biol* 17(5): 2550-8.
- Harmon, B. G., L. G. Adams, et al. (1989). "Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*." *Am J Vet Res* 50(4): 459-65.
- Harris, T. E., J. H. Albrecht, et al. (2001). "CCAAT/enhancer-binding protein-alpha cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding." *J Biol Chem* 276(31): 29200-9.
- Hart, P. D., J. A. Armstrong, et al. (1972). "Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria." *Infect Immun* 5(5): 803-7.
- Hayashida, K., T. Kitamura, et al. (1990). "Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9655-9.

- Hayes, C. E., F. E. Nashold, et al. (2003). "The immunological functions of the vitamin D endocrine system." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49(2): 277-300.
- Hedvat, C. V., J. Yao, et al. (2004). "Myeloid ELF1-like factor is a potent activator of interleukin-8 expression in hematopoietic cells." *J Biol Chem* 279(8): 6395-400.
- Hemmi, H. et T. R. Breitman (1987). "Combinations of recombinant human interferons and retinoic acid synergistically induce differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line HL-60." *Blood* 69(2): 501-7.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, et al. (2004). "Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism." *Cell* 117(3): 285-97.
- Hickstein, D. D., M. J. Hickey, et al. (1988). "Transcriptional regulation of the leukocyte adherence protein beta subunit during human myeloid cell differentiation." *J Biol Chem* 263(27): 13863-7.
- Hopewell, P. (1994). *Overview of Clinical Tuberculosis*. Tuberculosis. B. R. Bloom. Washington, DC, ASM Press: 637.
- Horiguchi, J., M. K. Warren, et al. (1986). "Expression of the macrophage specific colony-stimulating factor (CSF-1) during human monocytic differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* 141(3): 924-30.
- Horin, P., I. Rychlik, et al. (1999). "A complex pattern of microsatellite polymorphism within the bovine NRAMP1 gene." *Eur J Immunogenet* 26(4): 311-3.
- Hu, J., N. Bumstead, et al. (1997). "Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC." *Genome Res* 7(7): 693-704.
- Hu, X., X. Zhang, et al. (2001). "Differential effects of transforming growth factor on cell cycle regulatory molecules in human myeloid leukemia cells." *Oncogene* 20(47): 6840-50.
- Hu, X. et K. S. Zuckerman (2001). "Transforming growth factor: signal transduction pathways, cell cycle mediation, and effects on hematopoiesis." *J Hematother Stem Cell Res* 10(1): 67-74.
- Huang, Y. C., J. Y. Chen, et al. (2004). "Vitamin D3 receptor/Sp1 complex is required for the induction of p27Kip1 expression by vitamin D3." *Oncogene* 23(28): 4856-61.
- Hubert, N. et M. W. Hentze (2002). "Previously uncharacterized isoforms of divalent metal transporter (DMT)-1: implications for regulation and cellular function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12345-50.

- Imlay, J. A. et S. Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." *Science* 240(4857): 1302-9.
- Inoue, T., J. Kamiyama, et al. (1999). "Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements." *J Biol Chem* 274(45): 32309-17.
- Irvine, S. A., P. Foka, et al. (2005). "A critical role for the Sp1-binding sites in the transforming growth factor-beta-mediated inhibition of lipoprotein lipase gene expression in macrophages." *Nucleic Acids Res* 33(5): 1423-34.
- Jabado, N., F. Canonne-Hergaux, et al. (2002). "Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells." *Blood* 100(7): 2617-22.
- Jabado, N., A. Jankowski, et al. (2000). "Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane." *J Exp Med* 192(9): 1237-48.
- James, S. Y., M. A. Williams, et al. (1997). "Interaction of vitamin D derivatives and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in leukaemic cell differentiation." *Leukemia* 11(7): 1017-25.
- Ji, Y. et G. P. Studzinski (2004). "Retinoblastoma protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta are required for 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL60 cells." *Cancer Res* 64(1): 370-7.
- Jiang, Z., P. Georgel, et al. (2005). "CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling." *Nat Immunol* 6(6): 565-70.
- Jinnin, M., H. Ihn, et al. (2004). "Tenascin-C upregulation by transforming growth factor-beta in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1." *Oncogene* 23(9): 1656-67.
- Johnson, S. C. et B. S. Zwillig (1985). "Continuous expression of I-A antigen by peritoneal macrophages from mice resistant to *Mycobacterium bovis* (strain BCG)." *J Leukoc Biol* 38(5): 635-47.
- Jung, C. W., E. S. Kim, et al. (1999). "Antiproliferative effect of a vitamin D3 analog, EB1089, on HL-60 cells by the induction of TGF-beta receptor." *Leuk Res* 23(12): 1105-12.



- Jurado, R. L. (1997). "Iron, infections, and anemia of inflammation." *Clin Infect Dis* 25(4): 888-95.
- Kahlen, J. P. et C. Carlberg (1994). "Identification of a vitamin D receptor homodimer-type response element in the rat calcitriol 24-hydroxylase gene promoter." *Biochem Biophys Res Commun* 202(3): 1366-72.
- Kalra, R., D. C. Paderanga, et al. (1994). "Genetic analysis is consistent with the hypothesis that NF1 limits myeloid cell growth through p21ras." *Blood* 84(10): 3435-9.
- Kamimura, S., M. Gallieni, et al. (1995). "Microtubules mediate cellular 25-hydroxyvitamin D3 trafficking and the genomic response to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human monocytes." *J Biol Chem* 270(38): 22160-6.
- Kang, T. J. et G. T. Chae (2001). "Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients." *FEMS Immunol Med Microbiol* 31(1): 53-8.
- Karbassi, A., J. M. Becker, et al. (1987). "Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors." *J Immunol* 139(2): 417-21.
- Kaufmann, S. H. (2001). "How can immunology contribute to the control of tuberculosis?" *Nat Rev Immunol* 1(1): 20-30.
- Kaul, D., P. K. Anand, et al. (2004). "Cholesterol-sensor initiates *M. tuberculosis* entry into human macrophages." *Mol Cell Biochem* 258(1-2): 219-22.
- Kawabata, H., R. E. Fleming, et al. (2004). "Expression of hepcidin is down-regulated in TfR2 mutant mice manifesting a phenotype of hereditary hemochromatosis." *Blood*.
- Kawabata, H., T. Nakamaki, et al. (2001). "Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells." *Blood* 98(9): 2714-9.
- Kawabata, H., R. Yang, et al. (1999). "Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family." *J Biol Chem* 274(30): 20826-32.
- Kawase, T., M. Orikasa, et al. (1998). "Up-regulation of inducible nitric oxide (NO) synthase and NO production in HL-60 cells stimulated to differentiate by phorbol 12-myristate 13-acetate plus 1,25-dihydroxyvitamin D3 is not obtained with dimethylsulfoxide plus 1,25-dihydroxyvitamin D3." *Calcif Tissue Int* 63(1): 27-35.

- Khanna-Gupta, A., T. Zibello, et al. (1997). "CCAAT displacement protein (CDP/cut) recognizes a silencer element within the lactoferrin gene promoter." *Blood* 90(7): 2784-95.
- Khanna-Gupta, A., T. Zibello, et al. (2000). "Sp1 and C/EBP are necessary to activate the lactoferrin gene promoter during myeloid differentiation." *Blood* 95(12): 3734-41.
- Khanna-Gupta, A., T. Zibello, et al. (2003). "Chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies indicate a role for CCAAT enhancer binding proteins alpha and epsilon (C/EBP alpha and C/EBP epsilon ) and CDP/cut in myeloid maturation-induced lactoferrin gene expression." *Blood* 101(9): 3460-8.
- Kim, S. et P. Ponka (2000). "Effects of interferon-gamma and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2." *J Biol Chem* 275(9): 6220-6.
- Kirkland, M. A. (2004). "A phase space model of hemopoiesis and the concept of stem cell renewal." *Exp Hematol* 32(6): 511-9.
- Kobayashi, S. D., J. M. Voyich, et al. (2004). "Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease." *J Immunol* 172(1): 636-43.
- Koeffler, H. P., T. Amatruda, et al. (1984). "Induction of macrophage differentiation of human normal and leukemic myeloid stem cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its fluorinated analogues." *Cancer Res* 44(12 Pt 1): 5624-8.
- Koike, K., M. Ogawa, et al. (1987). "Recombinant murine granulocyte-macrophage (GM) colony-stimulating factor supports formation of GM and multipotential blast cell colonies in culture: comparison with the effects of interleukin-3." *J Cell Physiol* 131(3): 458-64.
- Kosak, S. T. et M. Groudine (2004). "Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation." *Genes Dev* 18(12): 1371-84.
- Kosugi, H., Y. Nakagawa, et al. (1995). "Gene structures of the alpha subunits of human IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors: comparison with the cytokine receptor superfamily." *J Allergy Clin Immunol* 96(6 Pt 2): 1115-25.
- Koul, A., T. Herget, et al. (2004). "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways." *Nat Rev Microbiol* 2(3): 189-202.

- Kramer, J., M. Malek, et al. (2003). "Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with *Salmonella enteritidis* in poultry." *Anim Genet* 34(5): 339-48.
- Krause, A., S. Neitz, et al. (2000). "LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity." *FEBS Lett* 480(2-3): 147-50.
- Kroncke, K. D. et C. Carlberg (2000). "Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide." *Faseb J* 14(1): 166-73.
- Kudo, K., H. Sano, et al. (2004). "Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor." *J Immunol* 172(12): 7592-602.
- Kuhn, D. E., B. D. Baker, et al. (1999). "Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169." *J Leukoc Biol* 66(1): 113-9.
- Kuhn, D. E., W. P. Lafuse, et al. (2001). "Iron transport into mycobacterium avium-containing phagosomes from an Nramp1(Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line." *J Leukoc Biol* 69(1): 43-9.
- Kuroda, M., H. Tanabe, et al. (2004). "Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation." *J Cell Sci* 117(Pt 24): 5897-903.
- Lacorazza, H. D., Y. Miyazaki, et al. (2002). "The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells." *Immunity* 17(4): 437-49.
- Lacorazza, H. D. et S. D. Nimer (2003). "The emerging role of the myeloid Elf-1 like transcription factor in hematopoiesis." *Blood Cells Mol Dis* 31(3): 342-50.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1989). "The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite." *Science* 243(4899): 1681-8.
- Lasorella, A., M. Nosedà, et al. (2000). "Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins." *Nature* 407(6804): 592-8.
- Latchman, D. (2004). *Eukaryotic Transcription Factors*. London, Elsevier.
- Lau, Y. L., G. C. Chan, et al. (1998). "The role of phagocytic respiratory burst in host defense against *Mycobacterium tuberculosis*." *Clin Infect Dis* 26(1): 226-7.

- Law, A. K., D. Gupta, et al. (2004). "TGF-beta1 induction of the adenine nucleotide translocator 1 in astrocytes occurs through Smads and Sp1 transcription factors." *BMC Neurosci* 5(1): 1.
- Leclercq, V., M. Lebastard, et al. (1996). "The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci." *J Immunol* 157(10): 4537-45.
- Lefevre, P., S. Melnik, et al. (2003). "Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme cis-regulatory elements in vivo." *Mol Cell Biol* 23(12): 4386-400.
- Lefstin, J. A. et K. R. Yamamoto (1998). "Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators." *Nature* 392(6679): 885-8.
- Lemaitre, B., J. M. Reichhart, et al. (1997). "Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14614-9.
- LeVan, T. D., J. W. Bloom, et al. (2001). "A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity." *J Immunol* 167(10): 5838-44.
- Levesque, M. C., M. R. Hobbs, et al. (1999). "Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria." *J Infect Dis* 180(6): 1994-2002.
- Levine, M. et R. Tjian (2003). "Transcription regulation and animal diversity." *Nature* 424(6945): 147-51.
- Li, L., S. He, et al. (2004). "Gene regulation by Sp1 and Sp3." *Biochem Cell Biol* 82(4): 460-71.
- Li, S. L., A. J. Valente, et al. (2001). "Transcriptional regulation of the p67phox gene: role of AP-1 in concert with myeloid-specific transcription factors." *J Biol Chem* 276(42): 39368-78.
- Li, Y. C., M. Amling, et al. (1998). "Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice." *Endocrinology* 139(10): 4391-6.

- Lieschke, G. J., D. Grail, et al. (1994). "Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization." *Blood* 84(6): 1737-46.
- Liu, M., M. H. Lee, et al. (1996). "Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937." *Genes Dev* 10(2): 142-53.
- Liu, W., W. C. Cao, et al. (2004). "VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study." *Int J Tuberc Lung Dis* 8(4): 428-34.
- Lu, L., D. Walker, et al. (1988). "Enhancement of release from MHC class II antigen-positive monocytes of hematopoietic colony stimulating factors CSF-1 and G-CSF by recombinant human tumor necrosis factor-alpha: synergism with recombinant human interferon-gamma." *Blood* 72(1): 34-41.
- Lyakh, L. A., M. Sanford, et al. (2005). "TGF- $\beta$  and Vitamin D3 Utilize Distinct Pathways to Suppress IL-12 Production and Modulate Rapid Differentiation of Human Monocytes into CD83+ Dendritic Cells." *J Immunol* 174(4): 2061-70.
- Mackenzie, B. et M. A. Hediger (2004). "SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1." *Pflugers Arch* 447(5): 571-9.
- MacMicking, J. D., R. J. North, et al. (1997). "Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10): 5243-8.
- MacMicking, J. D., G. A. Taylor, et al. (2003). "Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47." *Science* 302(5645): 654-9.
- Malik, Z. A., C. R. Thompson, et al. (2003). "Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca<sup>2+</sup> signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase." *J Immunol* 170(6): 2811-5.
- Marden, C. M., D. Stefanidis, et al. (2003). "Differentiation-dependent up-regulation of p47(phox) gene transcription is associated with changes in PU.1 phosphorylation and increased binding affinity." *Biochem Biophys Res Commun* 305(1): 193-202.
- Marecki, S., C. J. Rieneau, et al. (2001). "PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene." *J Immunol* 166(11): 6829-38.

- Martinez-Moczygemba, M. et D. P. Huston (2003). "Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF." *J Allergy Clin Immunol* 112(4): 653-65; quiz 666.
- Martin-Soudant, N., J. G. Drachman, et al. (2000). "CDP/Cut DNA binding activity is down-modulated in granulocytes, macrophages and erythrocytes but remains elevated in differentiating megakaryocytes." *Leukemia* 14(5): 863-73.
- Masson, P. L., J. F. Heremans, et al. (1969). "Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes." *J Exp Med* 130(3): 643-58.
- McCarthy, D. M., J. F. San Miguel, et al. (1983). "1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells." *Leuk Res* 7(1): 51-5.
- McGrath, J. W. (1988). "Social networks of disease spread in the lower Illinois valley: a simulation approach." *Am J Phys Anthropol* 77(4): 483-96.
- McKercher, S. R., B. E. Torbett, et al. (1996). "Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities." *Embo J* 15(20): 5647-58.
- McKie, A. T., D. Barrow, et al. (2001). "An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron." *Science* 291(5509): 1755-9.
- McKie, A. T., P. Marciani, et al. (2000). "A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation." *Mol Cell* 5(2): 299-309.
- Melo, M. D., I. R. Catchpole, et al. (2000). "Utilization of CD11b knockout mice to characterize the role of complement receptor 3 (CR3, CD11b/CD18) in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages." *Cell Immunol* 205(1): 13-23.
- Mendelsohn, N., H. S. Gilbert, et al. (1980). "Effect of maturation on the response of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) to the tumor promoter 12-o-tetradecanolyphorbol-13-acetate." *Cancer Res* 40(5): 1469-74.
- Metcalf, D. (1987). "The role of the colony-stimulating factors in resistance to acute infections." *Immunol Cell Biol* 65 ( Pt 1): 35-43.
- Metcalf, D., C. G. Begley, et al. (1986). "Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice." *Blood* 68(1): 46-57.

- Metcalf, D. et N. A. Nicola (1992). "The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations." *Blood* 79(11): 2861-6.
- Mezey, E., K. J. Chandross, et al. (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." *Science* 290(5497): 1779-82.
- Militi, S., R. Riccioni, et al. (2000). "Expression of interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor common chain betac, betaIT in normal haematopoiesis: lineage specificity and proliferation-independent induction." *Br J Haematol* 111(2): 441-51.
- Miller, E. N., S. E. Jamieson, et al. (2004). "Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians." *Genes Immun* 5(1): 63-7.
- Mira, M. T., A. Alcais, et al. (2004). "Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG." *Nature* 427(6975): 636-40.
- Mira, M. T., A. Alcais, et al. (2003). "Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population." *Nat Genet* 33(3): 412-5.
- Miyazaki, Y., P. Boccuni, et al. (2001). "Cyclin A-dependent phosphorylation of the ETS-related protein, MEF, restricts its activity to the G1 phase of the cell cycle." *J Biol Chem* 276(44): 40528-36.
- Miyazaki, Y., X. Sun, et al. (1996). "MEF, a novel transcription factor with an Elf-1 like DNA binding domain but distinct transcriptional activating properties." *Oncogene* 13(8): 1721-9.
- Mock, B., M. Krall, et al. (1990). "A genetic map of mouse chromosome 1 near the Lsh-Ity-Bcg disease resistance locus." *Genomics* 7(1): 57-64.
- Molina, R., L. Gradoni, et al. (2003). "HIV and the transmission of Leishmania." *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1: 29-45.
- Monack, D. M., A. Mueller, et al. (2004). "Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system." *Nat Rev Microbiol* 2(9): 747-65.
- Moon, N. S., P. Premdas, et al. (2001). "S phase-specific proteolytic cleavage is required to activate stable DNA binding by the CDP/Cut homeodomain protein." *Mol Cell Biol* 21(18): 6332-45.

- Morrissey, P. J. et K. Charrier (1990). "GM-CSF administration augments the survival of ity-resistant A/J mice, but not ity-susceptible C57BL/6 mice, to a lethal challenge with Salmonella typhimurium." *J Immunol* 144(2): 557-61.
- Muller, S., A. Maas, et al. (1999). "Synergistic activation of the human Btk promoter by transcription factors Sp1/3 and PU.1." *Biochem Biophys Res Commun* 259(2): 364-9.
- Muto, A., M. Kizaki, et al. (1999). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1)." *Blood* 93(7): 2225-33.
- Myers, R. M., K. Tilly, et al. (1986). "Fine structure genetic analysis of a beta-globin promoter." *Science* 232(4750): 613-8.
- Naar, A. M., B. D. Lemon, et al. (2001). "Transcriptional coactivator complexes." *Annu Rev Biochem* 70: 475-501.
- Nathan, C. (2002). "Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung." *Am J Respir Crit Care Med* 166(2): 130-1.
- Nelson, R. (2004). "WHO's tuberculosis control strategy said to be insufficient." *Lancet Infect Dis* 4(11): 653.
- Nemeth, E., A. Roetto, et al. (2004). "Hepcidin is decreased in TFR2-Hemochromatosis." *Blood*.
- Nemeth, E., M. S. Tuttle, et al. (2004). "Hepcidin Regulates Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization." *Science*.
- Nemeth, E., E. V. Valore, et al. (2003). "Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein." *Blood* 101(7): 2461-3.
- Nemunaitis, J., J. Cox, et al. (1998). "Comparison of neutrophil and monocyte function by microbicidal cell-kill assay in patients with cancer receiving granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or no cytokine after cytotoxic chemotherapy: a phase II trial." *Am J Clin Oncol* 21(3): 308-12.
- Nicholson, S., G. Bonecini-Almeida Mda, et al. (1996). "Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis." *J Exp Med* 183(5): 2293-302.



- Nicola, N. A. et G. R. Johnson (1982). "The production of committed hemopoietic colony-forming cells from multipotential precursor cells in vitro." *Blood* 60(4): 1019-29.
- Nicolas, G., C. Chauvet, et al. (2002). "The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation." *J Clin Invest* 110(7): 1037-44.
- Nicolas, G., L. Viatte, et al. (2003). "Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis." *Nat Genet* 34(1): 97-101.
- Nishinakamura, R., A. Miyajima, et al. (1996). "Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions." *Blood* 88(7): 2458-64.
- Norman, A. W., W. H. Okamura, et al. (1997). "Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans-locked analogs are preferred for genomic biological responses." *Mol Endocrinol* 11(10): 1518-31.
- Norman, A. W. et F. R. Silva (2001). "Structure function studies: identification of vitamin D analogs for the ligand-binding domains of important proteins in the vitamin D-endocrine system." *Rev Endocr Metab Disord* 2(2): 229-38.
- Nowak, S. J. et V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." *Trends Genet* 20(4): 214-20.
- Nuchprayoon, I., J. Shang, et al. (1999). "An enhancer located between the neutrophil elastase and proteinase 3 promoters is activated by Sp1 and an Ets factor." *J Biol Chem* 274(2): 1085-91.
- Olakanmi, O., L. S. Schlesinger, et al. (2002). "Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis." *J Biol Chem* 277(51): 49727-34.
- Olakanmi, O., L. S. Schlesinger, et al. (2004). "The nature of extracellular iron influences iron acquisition by *Mycobacterium tuberculosis* residing within human macrophages." *Infect Immun* 72(4): 2022-8.

- Omdahl, J. L., R. W. Gray, et al. (1972). "Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium." *Nat New Biol* 237(71): 63-4.
- OMS (2004). Tuberculose Aide-mémoire. Aide-mémoire. T. a. M. Information Resource Centre HIV.
- O'Reilly, D., M. Addley, et al. (2004). "Functional analysis of the murine *Emr1* promoter identifies a novel purine-rich regulatory motif required for high-level gene expression in macrophages." *Genomics* 84(6): 1030-40.
- O'Reilly, D., C. M. Quinn, et al. (2003). "Multiple Ets factors and interferon regulatory factor-4 modulate CD68 expression in a cell type-specific manner." *J Biol Chem* 278(24): 21909-19.
- Osborne, C. S., L. Chakalova, et al. (2004). "Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription." *Nat Genet* 36(10): 1065-71.
- Oster, W., A. Lindemann, et al. (1988). "Regulation of gene expression of M-, G-, GM-, and multi-CSF in normal and malignant hematopoietic cells." *Blood Cells* 14(2-3): 443-62.
- Overbergh, L., B. Decallonne, et al. (2000). "Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages." *Clin Exp Immunol* 120(1): 139-46.
- Pan, Q. et R. U. Simpson (1999). "c-myc intron element-binding proteins are required for 1, 25-dihydroxyvitamin D3 regulation of c-myc during HL-60 cell differentiation and the involvement of HOXB4." *J Biol Chem* 274(13): 8437-44.
- Pan, Q. et R. U. Simpson (2001). "Antisense knockout of HOXB4 blocks 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of c-myc expression." *J Endocrinol* 169(1): 153-9.
- Pan, Z., C. J. Hetherington, et al. (1999). "CCAAT/enhancer-binding protein activates the CD14 promoter and mediates transforming growth factor beta signaling in monocyte development." *J Biol Chem* 274(33): 23242-8.
- Park, C. H., E. V. Valore, et al. (2001). "Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver." *J Biol Chem* 276(11): 7806-10.
- Park, S. Y., H. M. Shin, et al. (2002). "Synergistic interaction of MEF2D and Sp1 in activation of the CD14 promoter." *Mol Immunol* 39(1-2): 25-30.

- Peleg, S., M. Sastry, et al. (1995). "Distinct conformational changes induced by 20-epi analogues of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 are associated with enhanced activation of the vitamin D receptor." *J Biol Chem* 270(18): 10551-8.
- Penna, G. et L. Adorini (2000). "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation." *J Immunol* 164(5): 2405-11.
- Peters, W. et J. D. Ernst (2003). "Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*." *Microbes Infect* 5(2): 151-8.
- Piemonti, L., P. Monti, et al. (2000). "Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* 164(9): 4443-51.
- Pigeon, C., G. Ilyin, et al. (2001). "A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload." *J Biol Chem* 276(11): 7811-9.
- Plant, J. et A. A. Glynn (1976). "Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice." *J Infect Dis* 133(1): 72-8.
- Plant, J. E., J. M. Blackwell, et al. (1982). "Are the Lsh and Ity disease resistance genes at one locus on mouse chromosome 1?" *Nature* 297(5866): 510-1.
- Poltorak, A., I. Smirnova, et al. (1998). "Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region." *Blood Cells Mol Dis* 24(3): 340-55.
- Ponka, P., C. Beaumont, et al. (1998). "Function and regulation of transferrin and ferritin." *Semin Hematol* 35(1): 35-54.
- Price, R. E., J. W. Templeton, et al. (1990). "Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*." *Infect Immun* 58(4): 879-86.
- Quesenberry, P. J., G. A. Colvin, et al. (2002). "The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory." *Blood* 100(13): 4266-71.
- Qureshi, S. T., L. Lariviere, et al. (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* 189(4): 615-25.
- Rachez, C. et L. P. Freedman (2000). "Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions." *Gene* 246(1-2): 9-21.

- Radomska, H. S., C. S. Huettner, et al. (1998). "CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors." *Mol Cell Biol* 18(7): 4301-14.
- Ralph, P. et I. Nakoinz (1987). "Stimulation of macrophage tumoricidal activity by the growth and differentiation factor CSF-1." *Cell Immunol* 105(2): 270-9.
- Rao, J., F. Zhang, et al. (1998). "Truncation of Sp1 transcription factor by myeloblastin in undifferentiated HL60 cells." *J Cell Physiol* 175(2): 121-8.
- Ratledge, C. (2004). "Iron, mycobacteria and tuberculosis." *Tuberculosis (Edinb)* 84(1-2): 110-30.
- Reitsma, P. H., P. G. Rothberg, et al. (1983). "Regulation of myc gene expression in HL-60 leukaemia cells by a vitamin D metabolite." *Nature* 306(5942): 492-4.
- Rekhtman, N., F. Radparvar, et al. (1999). "Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells." *Genes Dev* 13(11): 1398-411.
- Remus, N., J. El Baghdadi, et al. (2004). "Association of IL12RB1 polymorphisms with pulmonary tuberculosis in adults in Morocco." *J Infect Dis* 190(3): 580-7.
- Resendes, K. K. et A. G. Rosmarin (2004). "Sp1 control of gene expression in myeloid cells." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14(3): 171-81.
- Rich, A. et S. Zhang (2003). "Timeline: Z-DNA: the long road to biological function." *Nat Rev Genet* 4(7): 566-72.
- Richards, F. M., A. Watson, et al. (1988). "Investigation of the effects of heat shock and agents which induce a heat shock response on the induction of differentiation of HL-60 cells." *Cancer Res* 48(23): 6715-20.
- Richer, E., P. Courville, et al. (2003). "Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria." *J Mol Evol* 57(4): 363-76.
- Richer, E., P. Courville, et al. (2004). *Molecular Evolutionary Analysis of the Nramp Family. The Nramp Family. M. Cellier et P. Gros. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 200.*
- Roach, T. I., D. Chatterjee, et al. (1994). "Induction of early-response genes KC and JE by mycobacterial lipoarabinomannans: regulation of KC expression in murine macrophages by Lsh/Ity/Bcg (candidate Nramp)." *Infect Immun* 62(4): 1176-84.

- Rockett, K. A., R. Brookes, et al. (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line." *Infect Immun* 66(11): 5314-21.
- Rohlf, C., S. Ahmad, et al. (1997). "Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 272(34): 21137-41.
- Roig, E. A., E. Richer, et al. (2002). "Regulation of NRAMP1 gene expression by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D(3) in HL-60 phagocytes." *J Leukoc Biol* 71(5): 890-904.
- Rojas, M., M. Olivier, et al. (1999). "TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages." *J Immunol* 162(10): 6122-31.
- Rook, G. A. (1988). "The role of vitamin D in tuberculosis." *Am Rev Respir Dis* 138(4): 768-70.
- Rook, G. A., J. Steele, et al. (1986). "Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes." *Immunology* 57(1): 159-63.
- Rosenbauer, F., K. Wagner, et al. (2004). "Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1." *Nat Genet* 36(6): 624-30.
- Rosmarin, A. G., R. Levy, et al. (1992). "Cloning and analysis of the CD18 promoter." *Blood* 79(10): 2598-604.
- Rosmarin, A. G., M. Luo, et al. (1998). "Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter." *J Biol Chem* 273(21): 13097-103.
- Rosmarin, A. G., Z. Yang, et al. (2005). "Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis." *Exp Hematol* 33(2): 131-43.
- Roy, S., A. Frodsham, et al. (1999). "Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type." *J Infect Dis* 179(1): 187-91.
- Ryu, H., J. Lee, et al. (2003). "Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine repeats via an Sp1-dependent pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 4281-6.

- Sakai, T., M. Matsuoka, et al. (2001). "Missense mutation of the interleukin-12 receptor beta1 chain-encoding gene is associated with impaired immunity against Mycobacterium avium complex infection." *Blood* 97(9): 2688-94.
- Schaible, U. E., H. L. Collins, et al. (2002). "Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis." *J Exp Med* 196(11): 1507-13.
- Schaible, U. E., S. Sturgill-Koszycki, et al. (1998). "Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages." *J Immunol* 160(3): 1290-6.
- Schapiro, J. M., S. J. Libby, et al. (2003). "Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8496-501.
- Schlesinger, L. S. (1993). "Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors." *J Immunol* 150(7): 2920-30.
- Schultz, J. R., M. A. Loven, et al. (2002). "Differential modulation of DNA conformation by estrogen receptors alpha and beta." *J Biol Chem* 277(10): 8702-7.
- Schwartz, Z., H. Ehland, et al. (2002). "1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase." *Endocrinology* 143(7): 2775-86.
- Scott, E. W., M. C. Simon, et al. (1994). "Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages." *Science* 265(5178): 1573-7.
- Scott, L. M., C. I. Civin, et al. (1992). "A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells." *Blood* 80(7): 1725-35.
- Searle, S. et J. M. Blackwell (1999). "Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility." *J Med Genet* 36(4): 295-9.
- Searle, S., N. A. Bright, et al. (1998). "Localisation of Nramp1 in macrophages: modulation with activation and infection." *J Cell Sci* 111 ( Pt 19): 2855-66.

- Seki, Y., M. A. Suico, et al. (2002). "The ETS transcription factor MEF is a candidate tumor suppressor gene on the X chromosome." *Cancer Res* 62(22): 6579-86.
- Shaffer, P. L. et D. T. Gewirth (2002). "Structural basis of VDR-DNA interactions on direct repeat response elements." *Embo J* 21(9): 2242-52.
- Shin, H. H., J. Y. Seoh, et al. (1999). "Requirement of MEF2D in the induced differentiation of HL60 promyeloid cells." *Mol Immunol* 36(18): 1209-14.
- Siddiqui, M. R., S. Meisner, et al. (2001). "A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13." *Nat Genet* 27(4): 439-41.
- Simons, K. et D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-9.
- Singh, P. K., B. F. Tack, et al. (2000). "Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(5): L799-805.
- Skalnik, D. G., E. C. Strauss, et al. (1991). "CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter." *J Biol Chem* 266(25): 16736-44.
- Skamene, E., P. Gros, et al. (1982). "Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens." *Nature* 297(5866): 506-9.
- Spilianakis, C. G., M. D. Lalioti, et al. (2005). "Interchromosomal associations between alternatively expressed loci." *Nature* 435(7042): 637-45.
- Stadler, S., V. Schnapp, et al. (2004). "The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation." *BMC Cell Biol* 5(1): 44.
- Stanley, E. R., K. L. Berg, et al. (1997). "Biology and action of colony--stimulating factor-1." *Mol Reprod Dev* 46(1): 4-10.
- Stanley, S. A., S. Raghavan, et al. (2003). "Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 13001-6.
- Stevanin, T. M., N. Ioannidis, et al. (2000). "Flavo-hemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes bo' or bd, from nitric oxide." *J Biol Chem* 275(46): 35868-75.

- Studzinski, G. P., B. Rathod, et al. (1997). "Uncoupling of cell cycle arrest from the expression of monocytic differentiation markers in HL60 cell variants." *Exp Cell Res* 232(2): 376-87.
- Sturgill-Koszycki, S., U. E. Schaible, et al. (1996). "Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis." *Embo J* 15(24): 6960-8.
- Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, et al. (1994). "Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase." *Science* 263(5147): 678-81.
- Suda, J., T. Suda, et al. (1984). "Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of paired progenitors." *Blood* 64(2): 393-9.
- Suda, T., Y. Ueno, et al. (2003). "Vitamin D and bone." *J Cell Biochem* 88(2): 259-66.
- Suico, M. A., T. Koga, et al. (2004). "Sp1 is involved in the transcriptional activation of lysozyme in epithelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 324(4): 1302-8.
- Suico, M. A., Z. Lu, et al. (2004). "The regulation of human beta-defensin 2 by the ETS transcription factor MEF (myeloid Elf-1-like factor) is enhanced by promyelocytic leukemia protein." *J Pharmacol Sci* 95(4): 466-70.
- Supek, F., L. Supekova, et al. (1996). "A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 5105-10.
- Supek, F., L. Supekova, et al. (1997). "Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function." *J Exp Biol* 200 ( Pt 2): 321-30.
- Tabuchi, M., N. Tanaka, et al. (2002). "Alternative splicing regulates the subcellular localization of divalent metal transporter 1 isoforms." *Mol Biol Cell* 13(12): 4371-87.
- Takada, Y., E. F. Sato, et al. (2000). "Granulocyte-colony stimulating factor enhances anti-tumour effect of hyperthermia." *Int J Hyperthermia* 16(3): 275-86.
- Takahashi, N., T. Akatsu, et al. (1988). "Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation." *Endocrinology* 123(5): 2600-2.



- Takeshita, A., Y. Ozawa, et al. (2000). "Nuclear receptor coactivators facilitate vitamin D receptor homodimer action on direct repeat hormone response elements." *Endocrinology* 141(3): 1281-4.
- Tanaka, H., E. Abe, et al. (1982). "1 alpha,25-Dihydroxycholecalciferol and a human myeloid leukaemia cell line (HL-60)." *Biochem J* 204(3): 713-9.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." *Annu Rev Immunol* 19: 623-55.
- Taylor, G. A., C. G. Feng, et al. (2004). "p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens." *Nat Rev Immunol* 4(2): 100-9.
- Tenen, D. G., R. Hromas, et al. (1997). "Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia." *Blood* 90(2): 489-519.
- Thomas, V., S. Samanta, et al. (2005). "Anaplasma phagocytophilum modulates gp91phox gene expression through altered interferon regulatory factor 1 and PU.1 levels and binding of CCAAT displacement protein." *Infect Immun* 73(1): 208-18.
- Till, J. E., E. A. McCulloch, et al. (1964). "A Stochastic Model of Stem Cell Proliferation, Based on the Growth of Spleen Colony-Forming Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 29-36.
- Tocchini-Valentini, G., N. Rochel, et al. (2001). "Crystal structures of the vitamin D receptor complexed to superagonist 20-epi ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5491-6.
- Tosh, K., S. Meisner, et al. (2002). "A region of chromosome 20 is linked to leprosy susceptibility in a South Indian population." *J Infect Dis* 186(8): 1190-3.
- Touret, N., W. Furuya, et al. (2003). "Dynamic traffic through the recycling compartment couples the metal transporter Nramp2 (DMT1) with the transferrin receptor." *J Biol Chem* 278(28): 25548-57.
- Traver, D., T. Miyamoto, et al. (2001). "Fetal liver myelopoiesis occurs through distinct, prospectively isolatable progenitor subsets." *Blood* 98(3): 627-35.
- Truscott, M., L. Raynal, et al. (2003). "CDP/Cux stimulates transcription from the DNA polymerase alpha gene promoter." *Mol Cell Biol* 23(8): 3013-28.
- Tso, H. W., Y. L. Lau, et al. (2004). "Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population." *J Infect Dis* 190(5): 913-9.

- Turley, J. M., L. A. Falk, et al. (1996). "Transforming growth factor beta 1 functions in monocytic differentiation of hematopoietic cells through autocrine and paracrine mechanisms." *Cell Growth Differ* 7(11): 1535-44.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14459-63.
- Van Roozendaal, K. E., D. Darling, et al. (1990). "DMSO and retinoic acid induce HL-60 differentiation by different but converging pathways." *Exp Cell Res* 190(1): 137-40.
- Vassiliadis, S. et L. J. Guilbert (1991). "CSF-1 and immune interferon synergize to induce differentiation of human leukemic cells bearing CSF-1 receptors." *Leuk Res* 15(10): 943-52.
- Vellenga, E., A. Rambaldi, et al. (1988). "Independent regulation of M-CSF and G-CSF gene expression in human monocytes." *Blood* 71(6): 1529-32.
- Verrijzer, C. P. (2001). "Transcription factor IID--not so basal after all." *Science* 293(5537): 2010-1.
- Via, L. E., D. Deretic, et al. (1997). "Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7." *J Biol Chem* 272(20): 13326-31.
- Via, L. E., R. A. Fratti, et al. (1998). "Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation." *J Cell Sci* 111 ( Pt 7): 897-905.
- Vidal, S., M. L. Tremblay, et al. (1995). "The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene." *J Exp Med* 182(3): 655-66.
- Vidal, S. M., D. Malo, et al. (1993). "Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*." *Cell* 73(3): 469-85.
- Vidal, S. M., E. Pinner, et al. (1996). "Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1* D169) mouse strains." *J Immunol* 157(8): 3559-68.
- Volkman, H. E., H. Clay, et al. (2004). "Tuberculous Granuloma Formation Is Enhanced by a Mycobacterium Virulence Determinant." *PLoS Biol* 2(11): e367.

- Volpi, E. V., E. Chevret, et al. (2000). "Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei." *J Cell Sci* 113 ( Pt 9): 1565-76.
- Vulpe, C. D., Y. M. Kuo, et al. (1999). "Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse." *Nat Genet* 21(2): 195-9.
- Wang, Q. M., J. B. Jones, et al. (1996). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells." *Cancer Res* 56(2): 264-7.
- Ward, P. P. et O. M. Conneely (2004). "Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection." *Biometals* 17(3): 203-8.
- Weinstein, D. A., C. N. Roy, et al. (2002). "Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease." *Blood* 100(10): 3776-81.
- Wigley, P. (2004). "Genetic resistance to Salmonella infection in domestic animals." *Res Vet Sci* 76(3): 165-9.
- Williams, G. T., C. A. Smith, et al. (1990). "Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis." *Nature* 343(6253): 76-9.
- Williams, R. R. (2003). "Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning." *Trends Genet* 19(6): 298-302.
- Wing, E. J., N. M. Ampel, et al. (1985). "Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) enhances the capacity of murine macrophages to secrete oxygen reduction products." *J Immunol* 135(3): 2052-6.
- Wong, G., R. Gupta, et al. (2004). "1,25-Dihydroxyvitamin D and three low-calcemic analogs decrease UV-induced DNA damage via the rapid response pathway." *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90(1-5): 567-70.
- Wood, J. R., V. S. Likhite, et al. (2001). "Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements." *Mol Endocrinol* 15(7): 1114-26.
- Xie, H., M. Ye, et al. (2004). "Stepwise reprogramming of B cells into macrophages." *Cell* 117(5): 663-76.

- Yamaji, S., P. Sharp, et al. (2004). "Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin." *Blood* 104(7): 2178-80.
- Yamamoto, Y., T. W. Klein, et al. (1996). "Induction of cytokine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and chemokine macrophage inflammatory protein 2 mRNAs in macrophages by *Legionella pneumophila* or *Salmonella typhimurium* attachment requires different ligand-receptor systems." *Infect Immun* 64(8): 3062-8.
- Yang, W. et L. P. Freedman (1999). "20-Epi analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D3 are highly potent inducers of DRIP coactivator complex binding to the vitamin D3 receptor." *J Biol Chem* 274(24): 16838-45.
- Yeung, I. Y., E. Phillips, et al. (2004). "Oxidant regulation of the bivalent cation transporter Nramp1." *Biochem Soc Trans* 32(Pt 6): 1008-10.
- Yu, B., P. K. Datta, et al. (2003). "Stability of the Sp3-DNA complex is promoter-specific: Sp3 efficiently competes with Sp1 for binding to promoters containing multiple Sp-sites." *Nucleic Acids Res* 31(18): 5368-76.
- Zanello, L. P. et A. W. Norman (1997). "Stimulation by 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -vitamin D3 of whole cell chloride currents in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. A structure-function study." *J Biol Chem* 272(36): 22617-22.
- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, et al. (1994). "Regulation of CD14 expression during monocytic differentiation induced with 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3." *J Immunol* 153(7): 3276-84.
- Zhang, D. E., C. J. Hetherington, et al. (1994). "Sp1 is a critical factor for the monocytic specific expression of human CD14." *J Biol Chem* 269(15): 11425-34.
- Zhang, P., G. Behre, et al. (1999). "Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15): 8705-10.
- Zhang, P., E. Nelson, et al. (2002). "Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways." *Blood* 99(12): 4406-12.
- Zhao, C., B. Papadopoulou, et al. (2004). "*Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network." *Clin Immunol* 113(1): 81-8.
- Zheng, X., A. Karsan, et al. (2002). "Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils

through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways." *Immunology* 107(3): 306-15.

Zwilling, B. S., D. E. Kuhn, et al. (1999). "Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth." *Infect Immun* 67(3): 1386-92.

## Annexe 1

Roig EA, Richer E, Canonne-Hergaux F, Gros P, Cellier MF. Regulation of NRAMP1 gene expression by 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D(3) in HL-60 phagocytes. J Leukoc Biol. 2002 May;71(5):890-904.

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*

## Annexe 2

Canonne-Hergaux F, Calafat J, Richer E, Cellier M, Grinstein S, Borregaard N, Gros P. Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):268-75. PubMed PMID: 12070036. doi: 10.1182/blood.V100.1.268

*Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.*