

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude de la régulation du gène *mntH* de *Escherichia coli*

par

Isabelle Bergevin

Mémoire présenté pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Richard Villemur, INRS-IAF

Examineur externe

Mario Jacques, Université de Montréal

Directeur de recherche

Mathieu Cellier, INRS-IAF

Codirecteur de recherche

François Shareck, INRS-IAF

RÉSUMÉ

La protéine MntH de *E. coli* (MntH_{Ec}) est un homologue bactérien des protéines Nramp eucaryotes qui sont impliquées dans le contrôle de la réplication des pathogènes intra-cellulaires des macrophages. MntH_{Ec} est un transporteur de manganèse à haute affinité dépendant du proton, dont les substrats secondaires incluent le Fe²⁺ et le Co²⁺. Afin d'étudier la régulation du gène *mntH*, une souche contenant une fusion transcriptionnelle intra-chromosomique *PmntH*-luciférase a été construite. L'activité du promoteur de *mntH* (*PmntH*), telle que mesurée à l'aide de la lumière produite par la luciférase, est induite en présence de chélateurs de métaux divalents tels le 2,2'-dipyridyl (DP), ainsi qu'en présence de peroxyde d'hydrogène. L'expression de la fusion *PmntH*-luciférase et le transport de manganèse dans les cellules augmentent significativement dans une souche qui n'exprime pas le répresseur Fur (ferric uptake regulator). La liaison de la protéine Fur au promoteur de *mntH* a été démontrée *in vitro*. L'activité de *PmntH* en milieu minimum est dépendante de la quantité de Fe²⁺ dans le milieu, mais un excès de Co²⁺ ou Mn²⁺ peut rétablir la répression du gène en conditions limitantes en fer. Le gène *fur* est requis pour assurer une répression complète du gène *mntH* en présence de fer, toutefois l'induction du gène en conditions de privation en fer persiste en absence de *fur*. D'autre part, le gène *fur* est essentiel pour la répression de *mntH* en présence de Co²⁺ mais il n'influence pas la répression Mn²⁺-dépendante du gène. Un double mutant *mntH fur* présente un défaut de croissance en milieu minimum. Ce défaut a pu être corrigé par l'ajout de manganèse dans le milieu ou encore par la sur-expression du gène *mntH*. Finalement, une mutation dans le gène *mntH* rend *E. coli* plus sensible au stress oxydatif causé par l'exposition au peroxyde d'hydrogène. La sensibilité a pu être éliminée par la supplémentation du milieu avec du Mn²⁺. Les implications de la régulation par le fer d'un transporteur de manganèse seront discutées en relation avec les mécanismes de résistance au stress oxydatif.



Isabelle Bergevin



Mathieu Cellier



François Shareck

REMERCIEMENTS

Je désire remercier mon directeur de recherche, le docteur Mathieu Cellier, ainsi que mon co-directeur, le docteur François Shareck, pour m'avoir guidée au long de ce projet.

Je tiens à remercier les collaborateurs suivants pour leurs conseils et pour le partage de réactifs : Dr. Danielle Touati (Institut Jacques-Monod, Paris) et Dr. Michael Dubow (Université McGill).

J'aimerais remercier le technicien Jacques Beaubien pour la réalisation des expériences de transport de métaux dans les bactéries et pour son aide technique, mais surtout pour son amitié. Je remercie la stagiaire Evelyn Castillo pour avoir réalisé la seconde étape de la construction du plasmide pGBmntHEc Δ .

J'adresse un gros merci à Étienne Richer pour son aide précieuse entre autres lors des expériences impliquant la manipulation d'isotopes radioactifs, ainsi que pour tous les beaux moments passés ensemble au labo. Merci à Élise Boyer pour son aide et sa collaboration et pour sa compréhension lors des moments difficiles. J'aimerais aussi remercier les autres membres du laboratoire, Pascal Courville et Hortence Makui.

Je remercie de tout mon coeur mon conjoint, Benoît, pour sa patience et sa compréhension, mes parents, Hélène et Pierre, qui ont accordé tant d'importance à mon éducation, et mon frère, Nicolas, qui n'hésite jamais à dire qu'il est fier de sa petite soeur.

Un merci particulier à mes grandes amies, Dominique, Mélanie et Geneviève. Les moments difficiles ont été compensés mille fois par le fait des vous avoir rencontrées... Merci aussi à Fred, Julien, Angélique, Dominique, Manon et Louis, avec qui j'ai passé plusieurs moments agréables.

J'aimerais enfin remercier la Fondation Armand-Frappier et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour le soutien financier.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
1. INTRODUCTION.....	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 Transport du fer par les bactéries.....	5
2.1.1 Transport du fer ferrique.....	5
2.1.2 Transport du fer ferreux.....	9
2.2 Importance du fer lors de l'infection.....	9
2.3 La régulation du transport de fer dans les bactéries.....	11
2.3.1 Le répresseur Fur.....	11
2.3.2 Le répresseur DtxR.....	15
2.4 Relation entre le stress oxydatif et le métabolisme du fer.....	16
2.4.1 Les causes du stress oxydatif.....	16
2.4.2 Les mécanismes de détoxification.....	17
2.4.3 La régulation de la réponse au stress oxydatif.....	19
2.4.4 Le lien étroit entre le métabolisme du fer et le stress oxydatif.....	21
2.5 La famille Nramp et ses homologues bactériens.....	21
2.5.1 Nramp1 et la résistance aux pathogènes intra-cellulaires des macrophages.....	21

2.5.2	Nramp2 et les autres membres de la famille Nramp retrouvés chez les eucaryotes.....	23
2.5.3	La famille MntH: homologues Nramp bactériens.....	25
2.5.4	Rôle des MntH du groupe A dans le transport du manganèse.....	28
2.5.5	Le rôle de la famille Nramp dans les relations hôte-pathogène.....	29
2.6	Importance du manganèse pour la croissance et la virulence.....	32
2.7	Les autres transporteurs de manganèse retrouvés dans les bactéries.....	33
2.8	La régulation du transport de manganèse dans les bactéries.....	34
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	36
3.1	Souches bactériennes et milieux de culture.....	37
3.2	Produits chimiques et réactifs de biologie moléculaire.....	39
3.3	Manipulations d'ADN.....	39
3.3.1	Extraction de plasmides.....	39
3.3.2	Réactions de polymérase en chaîne.....	42
3.3.3	Réactions à l'aide d'enzymes de modification et purification des fragments.....	43
3.3.4	Électrophorèse des fragments d'ADN.....	45
3.4	Préparation de cellules compétentes et transformation.....	45
3.5	Construction d'une fusion intra-chromosomique <i>PmntH</i> -luciférase.....	47
3.6	Construction de plasmides permettant de compléter la croissance.....	48
3.7	Transductions de mutations à l'aide du phage P1.....	51
3.8	Mesures du transport de manganèse.....	52
3.9	Mesures d'expression de la fusion <i>PmntH</i> -luciférase.....	53
3.10	Buvarpage de type Northern.....	54
3.11	Expériences de retard sur gel.....	57

3.12 Expériences de croissance en milieu minimal.....	59
3.13 Tests de diffusion sur milieu solide.....	59
4. RÉSULTATS.....	60
4.1 Construction d'une fusion transcriptionnelle <i>PmntH</i> -luciférase.....	61
4.2 L'expression de <i>PmntH-luc</i> augmente en présence de chélateurs de métaux.....	61
4.3 Rôle du répresseur Fur dans la régulation du gène <i>mntH</i>	66
4.4 Régulation de <i>PmntH-luc</i> par les métaux: comparaison des souches <i>PmntH</i> et <i>PmntHfur</i>	69
4.5 Régulation de <i>PmntH-luc</i> en milieu minimal: comparaison des souches <i>PmntH</i> et <i>PmntHfur</i>	74
4.6 Régulation de <i>PmntH-luc</i> en milieu minimal: effet de l'absence de manganèse.....	81
4.7 Effet du peroxyde d'hydrogène sur l'expression de <i>PmntH-luc</i>	81
4.8 Liaison de la protéine Fur au promoteur du gène <i>mntH</i>	86
4.9 Le défaut de croissance de la souche <i>PmntHfur</i> est corrigé en présence de Mn ou par la sur-expression du gène <i>mntH</i>	87
4.10 Sensibilité au stress oxydatif des mutants <i>mntH</i>	90
5. DISCUSSION.....	95
6. CONCLUSION.....	106
7. BIBLIOGRAPHIE.....	109

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Transport du complexe Fe ³⁺ -entérobactine dans la bactérie <i>E. coli</i>	8
Figure 2.	Mécanisme d'action du répresseur Fur.....	13
Figure 3.	Analyse évolutive de la famille MntH/Nramp.....	27
Figure 4.	Modèle proposé pour expliquer le rôle de la famille Nramp dans les relations hôte-pathogène.....	31
Figure 5.	Vérification de la création d'une fusion intra-chromosomique <i>PmntH-luciférase</i>	50
Figure 6.	Représentation schématique de la fusion intra-chromosomique <i>PmntH-luciférase</i>	63
Figure 7.	Régulation du gène <i>mntH</i> par le DP.....	65
Figure 8.	Activité de la fusion <i>PmntH-luc</i> en présence de chélateurs de métaux.....	68
Figure 9.	Contribution de la protéine Fur à la régulation du gène <i>mntH</i>	71
Figure 10.	Effet des métaux divalents sur la capacité du DP à induire la fusion <i>PmntH-luc</i>	73
Figure 11.	Effet de la concentration de Fe ²⁺ sur l'activité de la fusion <i>PmntH-luc</i>	76
Figure 12.	Effet du Co ²⁺ sur l'activité de la fusion <i>PmntH-luc</i>	78
Figure 13.	Effet du Mn ²⁺ sur l'activité de la fusion <i>PmntH-luc</i>	80
Figure 14.	Effet de l'absence de manganèse sur la régulation de <i>PmntH-luc</i> en milieu minimum.....	83
Figure 15.	Induction du gène <i>mntH</i> par le peroxyde d'hydrogène.....	85
Figure 16.	Liaison du répresseur Fur au promoteur de <i>mntH</i>	89
Figure 17.	La souche <i>PmntHfur</i> présente un défaut de croissance en milieu minimum.....	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Souches bactériennes et plasmides.....	38
Tableau 2.	Oligonucléotides utilisés lors des réactions de PCR.....	41
Tableau 3.	Sensibilité de différentes souches au peroxyde d'hydrogène.....	93
Tableau 4.	Sensibilité de différentes souches au paraquat.....	94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BSA :	« bovine serum albumin »
BPS :	acide bathophénanthroline disulfonique disodique
cat :	chloramphénicol acétyl transférase
CCCP :	hydrazone méta-chlorophénylique de cyanure carbonyle
CIP :	« calf intestinal phosphatase »
Cm :	chloramphénicol
CPM:	comptes par minute
DMSO :	sulfoxyde de diméthyle
dNTP :	désoxynucléotides triphosphates
DO₆₀₀ :	densité optique à 600 nm
DP :	2,2'-dipyridyl
DPTA :	acide 1,3-diaminopropane-N,N,N',N'-tétra-acétique
EDTA :	acide éthylène diamine tétra-acétique
BrEt :	bromure d'éthidium
Fz :	acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phénylsulfonique)-1,2,4-triazine (Ferrozine)
G/M :	milieu minimum basé sur celui de Neidhardt <i>et al.</i> (1974)
HEPES :	acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
kan :	kanamycine
kb :	kilobases
LB :	milieu Luria-Bertani
MOPS :	acide 3-morpholinopropanesulfonique
NTA :	acide nitrilotriacétique

OLB :	« oligo-labelling buffer »
pb :	paires de bases
PCR :	réaction de polymérase en chaîne
PEG :	polyéthylène glycol
SDS:	sodium dodécyl sulfate
SOD :	superoxyde dismutase
TBE :	tampon Tris-borate-EDTA
TPEN :	N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridyl-méthyl)éthylènediamine
Ts :	thermo-sensible
TSS :	« transformation and storage solution »
T₄PNK :	polynucléotide kinase T4

1. INTRODUCTION

Les études sur le transport des métaux par les bactéries ont longtemps porté presque exclusivement sur le fer, de sorte que le rôle de ce métal dans la croissance et la virulence est relativement bien compris. Le manganèse est aussi nécessaire à la survie de la plupart des bactéries, mais en quantités souvent trop faibles pour être évaluées de façon exacte. Le rôle du manganèse dans la détoxification des radicaux oxygénés, par son association avec les Mn-superoxyde dismutases, est connu depuis longtemps. Par contre, l'étude du transport de manganèse dans les bactéries est un sujet qui commence à peine à être exploré. L'association entre le transport de manganèse et la virulence n'a pas encore été clairement établie. Toutefois, les quelques pathogènes connus qui utilisent le manganèse au lieu du fer pour la croissance sont certainement avantagés dans des conditions de privation de fer par l'hôte. Certaines espèces semblent posséder plus d'un type de transporteur de manganèse. Cette redondance dans les systèmes d'acquisition pour un métal indique souvent un besoin physiologique particulier de la bactérie pour l'ion en question. Le peu d'information disponible fait que l'étude du transport de manganèse est un sujet qui mérite d'être approfondi.

Une famille de transporteurs nommée MntH a été identifiée récemment chez les bactéries. Ces transporteurs sont des homologues des protéines de la famille Nramp des eucaryotes, qui comprend des transporteurs de métaux divalents impliqués entre autres dans l'homéostasie du fer et dans la résistance aux pathogènes intra-cellulaires des macrophages. Les premières études portant sur les protéines MntH des bactéries ont permis de déterminer que celles-ci transportent le manganèse de façon préférentielle, mais qu'elles peuvent aussi transporter plusieurs autres cations divalents.

Le but principal de la recherche présentée dans ce mémoire de maîtrise était d'étudier la régulation du gène *mntH* de *E. coli*, afin de mieux comprendre le rôle des transporteurs de manganèse dans la physiologie des bactéries. Les études de fonction du gène *mntH* qui avaient été effectuées dans le laboratoire du Dr. Cellier nous ont permis de formuler certaines hypothèses de départ. La première hypothèse était que le gène *mntH*, dont le produit est un transporteur de cations divalents, serait régulé en réponse à la quantité d'ions métalliques dans le milieu. La seconde hypothèse était que le répresseur

Fur participe à la régulation du gène *mntH*, puisque le produit de ce gène peut transporter le fer. La dernière hypothèse était que MntH est impliqué dans la résistance au stress oxydatif, par transport de manganèse qui est essentiel à l'action de certaines enzymes de détoxification. Afin de vérifier ces hypothèses, les objectifs d'étude suivants ont été élaborés. Le premier objectif de la présente étude consistait à construire une fusion transcriptionnelle chromosomique entre le promoteur du gène *mntH* de *E. coli* et le gène rapporteur de la luciférase. La mise en place de cet outil de travail était essentielle à l'atteinte du second objectif, qui consistait à étudier l'influence de divers facteurs environnementaux sur l'expression du gène *mntH*. Le troisième objectif était de déterminer l'influence de certains facteurs de transcription, dont le répresseur Fur, sur la régulation de *mntH*. Finalement, le dernier objectif de cette étude était d'étudier le rôle de *mntH* dans la résistance au stress oxydatif.

Dans la première partie de cet ouvrage, la revue de la littérature pertinente au sujet de recherche est présentée. Cette section traite particulièrement de l'importance du fer et du manganèse et de la régulation du transport de ces métaux dans les bactéries, des mécanismes de défense contre le stress oxydatif et de la famille de transporteurs Nramp/MntH. Cette section est suivie d'un résumé des techniques expérimentales utilisées pour réaliser cette étude, d'une description des résultats les plus importants obtenus dans le cadre de cette recherche et finalement d'une discussion des résultats par rapport à ceux publiés par d'autres groupes ayant étudié la régulation du gène *mntH* chez les entérobactéries.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Transport du fer par les bactéries

2.1.1 Transport du fer ferrique

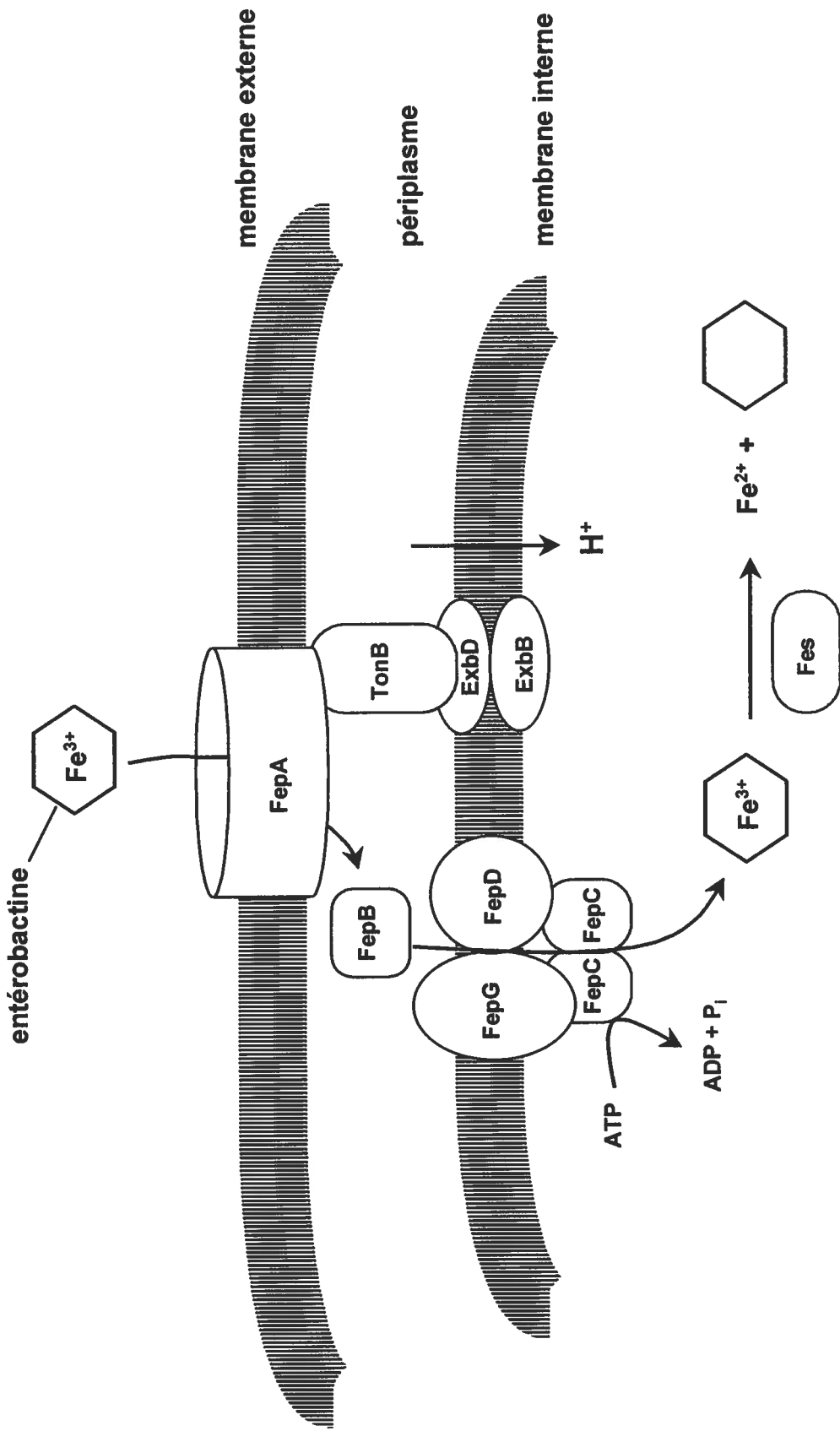
Les métaux divalents tels le fer et le manganèse sont essentiels à la vie en général et constituent une ressource limitée. Le fer est requis pour la croissance de la plupart des espèces de bactéries mais on le retrouve en quantités limitées dans l'environnement. (Wooldridge et Williams, 1993). En présence d'oxygène, le fer est présent sous sa forme oxydée (Fe^{3+} ou fer ferrique). À pH neutre, le fer ferrique est insoluble. Les microbes produisent des sidérophores, qui sont des molécules pouvant complexer cet ion avec une affinité remarquable (Silver et Walderhaug, 1992). Les sidérophores sont des molécules dont la masse est généralement inférieure à 1000 daltons. Les deux classes de sidérophores les plus importantes sont les acides hydroxamiques et les cathécolds. La bactérie *E. coli* synthétise des molécules des deux classes, soit l'entérobactine, un catéchol, et l'aérobactine, un acide hydroxamique (Silver et Walderhaug, 1992).

Les complexes Fe^{3+} -sidérophore entrent dans la cellule par l'entremise de transporteurs spécifiques. Dans le cas de l'entérobactine, les produits d'au moins huit gènes sont impliqués dans le transport du complexe Fe^{3+} -sidérophore au travers des deux membranes. La protéine FepA agit en tant que récepteur de surface pour le complexe Fe^{3+} -entérobactine et permet aussi au complexe de traverser la membrane externe. La protéine FepA comporte dans sa région N-terminale un motif de séquence polypeptidique nommée "boîte TonB", qui lui permet d'interagir avec la protéine TonB, dont la portion N-terminale est ancrée dans la membrane plasmique. Cette interaction avec la protéine TonB permet de transduire l'énergie potentielle de membrane nécessaire au transport du sidérophore à travers la membrane externe. TonB fonctionne de pair avec les protéines ExbB et ExbD qui permettent à TonB de s'associer à la membrane plasmique et d'adopter la conformation nécessaire pour répondre à la force proton-motrice (Silver et Walderhaug, 1992; Held et Postle, 2002). La séquence consensus de la boîte TonB est aussi retrouvée dans d'autres protéines de la membrane externe telles IutA (transport du complexe Fe^{3+} -aérobactine) et FecA (transport du complexe Fe^{3+} -citrate). Il est à noter

que chez *E. coli*, toutes les protéines de la membrane externe impliquées dans le transport de complexes Fe-sidérophores qui sont connues jusqu'à présent dépendent du complexe TonB-ExbB-ExbD (Moeck et Coulton, 1998). Après avoir traversé la membrane externe, la protéine de liaison périplasmique FepB permet de diriger le complexe Fe^{3+} -entérobactine vers les transporteurs situés dans la membrane plasmique. Les protéines FepD et FepG sont les composantes membranaires du transporteur tandis que la protéine FepC est associée à la membrane et sert à l'hydrolyse de l'ATP. Finalement, la protéine Fes est une estérase qui permet de dissocier le Fe^{3+} de l'entérobactine. La réduction subséquente du Fe^{3+} en Fe^{2+} le rend utilisable par la cellule (Silver et Walderhaug, 1992). La figure 1 résume le transport du complexe Fe^{3+} -entérobactine dans la bactérie *E. coli*.

Le transport du fer par l'aérobactine, un acide hydroxamique, ainsi que le transport de tous les autres sidérophore étudiés dans *E. coli* et dans d'autres bactéries Gram-négatives, se produit par des mécanismes semblables à celui décrit pour l'entérobactine (Silver et Walderhaug, 1992; Carson *et al.*, 1999). Par exemple, dans le cas de l'aérobactine, le complexe Fe^{3+} -sidérophore se lie à un récepteur de la membrane externe nommé IutA, qui dépend du complexe TonB-ExbB-ExbD. Le transport au travers du périplasma et de la membrane interne se fait par l'entremise de protéines de transport communes à tous les sidérophores appartenant au groupe des acides hydroxamiques. Dans ce système, une protéine de liaison périplasmique nommée FhuD dirige le complexe Fe^{3+} -sidérophore vers le transporteur membranaire, FhuB, qui permet la translocation du complexe au travers de la membrane. La protéine FhuC hydrolyse l'ATP et fournit l'énergie nécessaire au transport (Schultz-Hauser *et al.*, 1992; Wooldridge *et al.*, 1992). Dans le cas de l'aérobactine, le complexe Fe^{3+} -sidérophore est dissocié par la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} . Puisque l'affinité de l'aérobactine pour le fer ferreux est faible, l'ion est libéré et le sidérophore peut être réutilisé suite à son excrétion dans le milieu (Crosa, 1989).

Figure 1. Transport du complexe Fe³⁺-entérobactine dans la bactérie *E. coli*. La protéine FepA permet à l'entérobactine de traverser la membrane externe. Ce processus requiert la transduction de l'énergie provenant de la membrane interne par le complexe TonB-ExbB-ExbD. La protéine périplasmique FepB assure la liaison du complexe Fe-sidérophore de la membrane externe à la membrane interne. Les protéines FepD et FepG permettent ensuite le transport du complexe au travers de la membrane interne. Cette étape requiert l'hydrolyse de l'ATP par la protéine FepC. Finalement, l'estérase Fes permet la dissociation du complexe Fe³⁺-entérobactine, ainsi que la réduction du fer. Figure adaptée de Silver et Walderhaug, 1992 et de Chang *et al.*, 2001.



2.1.2 Transport du fer ferreux

En conditions d'anaérobiose, on retrouve le fer dans sa forme réduite. *E. coli* est une bactérie retrouvée principalement dans l'intestin des mammifères, où elle aide à maintenir un environnement anaérobiose. Il n'est donc pas surprenant que cette bactérie possède des systèmes pour le transport du fer ferreux. Le fer ferreux (Fe^{2+}) est soluble et diffuse librement au travers de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. L'ion ferreux peut ensuite traverser la membrane plasmique à l'aide de transporteurs à haute affinité. Le transporteur Feo a été découvert chez *E. coli*. La protéine FeoB a été identifiée comme étant la composante membranaire du transporteur. Celle-ci comporte deux séquences homologues aux sites de liaison aux nucléotides de certaines ATPases. Il est donc probable que le transport de fer ferreux soit ATP-dépendant (Kammler *et al.*, 1993). Toutefois, très peu d'études ont été effectuées sur le transporteur Feo de *E. coli* depuis la caractérisation initiale du transporteur en 1993. Des homologues de *feoB* ont été identifiés dans *Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori* et dans la cyanobactérie *Synechocystis* PCC 6803 (Tsolis *et al.*, 1996; Robey et Cianciotto, 2002; Velayudhan *et al.*, 2000; Katoh *et al.*, 2001). Dans tous les cas, le produit du gène est un transporteur de fer ferreux à haute affinité.

2.2 Importance du fer lors de l'infection

Le fer est un micronutriment essentiel à la croissance de la plupart des bactéries. En effet, celui-ci sert de co-facteur à plusieurs métalloenzymes nécessaires à leur survie. Parmi celles-ci, on retrouve l'aconitase et les fumarases A et B, qui sont impliquées dans la glycolyse (Benov, 2001; Park et Gunsalus, 1995; Storz et Imlay, 1999), ainsi que des enzymes impliquées dans la détoxification des radicaux oxygénés, telles la Fe-superoxyde dismutase, et les catalases (Agranoff et Krishna, 1998; Loewen et Switala, 1986). Chez les mammifères, le fer se trouve principalement sous une forme chélatée (Wooldridge et Williams, 1993). Celui-ci est complexé à la transferrine au niveau du sang et du système lymphatique, et à la lactoferrine dans les sécrétions provenant des muqueuses (Viswanathan et Cianciotto, 2001). En temps normal chez l'humain, la quantité de fer

libre est d'environ 10^{-18} M, ce qui est inférieur à la concentration nécessaire à la croissance de la plupart des bactéries (Bullen, 1981). En réponse à l'infection, l'hôte réduit encore davantage la disponibilité du fer présent dans les milieux extracellulaire et intracellulaire, soit jusqu'à environ 30% des niveaux normaux (Tsolis *et al.*, 1996). Les pathogènes réussissent à obtenir le fer nécessaire à leur croissance en contournant les défenses de l'hôte par diverses stratégies telles l'occupation de niches intra-cellulaires, l'utilisation de composés produits par l'hôte et la production de sidérophores (Wooldridge et Williams, 1993).

De nombreuses études ont démontré la relation entre le transport de fer et la pathogénicité. Par exemple, on retrouve un groupe de gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la régulation du sidérophore yersiniabactin sur un îlot de pathogénicité présent uniquement chez certaines souches hautement pathogènes appartenant au genre *Yersinia* (Carniel, 1999). Plusieurs études ont aussi démontré que des souches pathogènes des genres *Neisseria* et *Pasteurella* expriment des récepteurs, tels que la protéine TbpA de *Neisseria gonorrhoeae*, qui leur permettent de transporter le fer complexé à la transferrine et à la lactoferrine produites par l'hôte (Gray-Owen et Schryvers, 1996; Schryvers et Stojilkovic, 1999). Ces récepteurs sont associés à la membrane externe et dépendent de la protéine TonB (Kenney et Cornelissen, 2002). Lors d'expériences de colonisation mixte de l'intestin de souris, la bactérie *Salmonella enterica*, sérovar *typhimurium* portant une mutation dans le gène *feoB* est supplantée par la souche originelle (Tsolis *et al.*, 1996). Une souche de *Helicobacter pylori* avec une mutation dans le gène *feoB* est incapable de coloniser la muqueuse gastrique de souris infectées (Velayudhan *et al.*, 2000). Finalement, des études récentes effectuées dans le laboratoire du Dr. Cellier ont démontré que des souches de *S. typhimurium* portant des mutations dans les gènes *feoB* ou *sitABCD* sont atténuées dans un modèle d'infection intra-veineuse de souris sv129 *Nramp*^{-/-} (Boyer *et al.*, 2002).

2.3 La régulation du transport de fer dans les bactéries

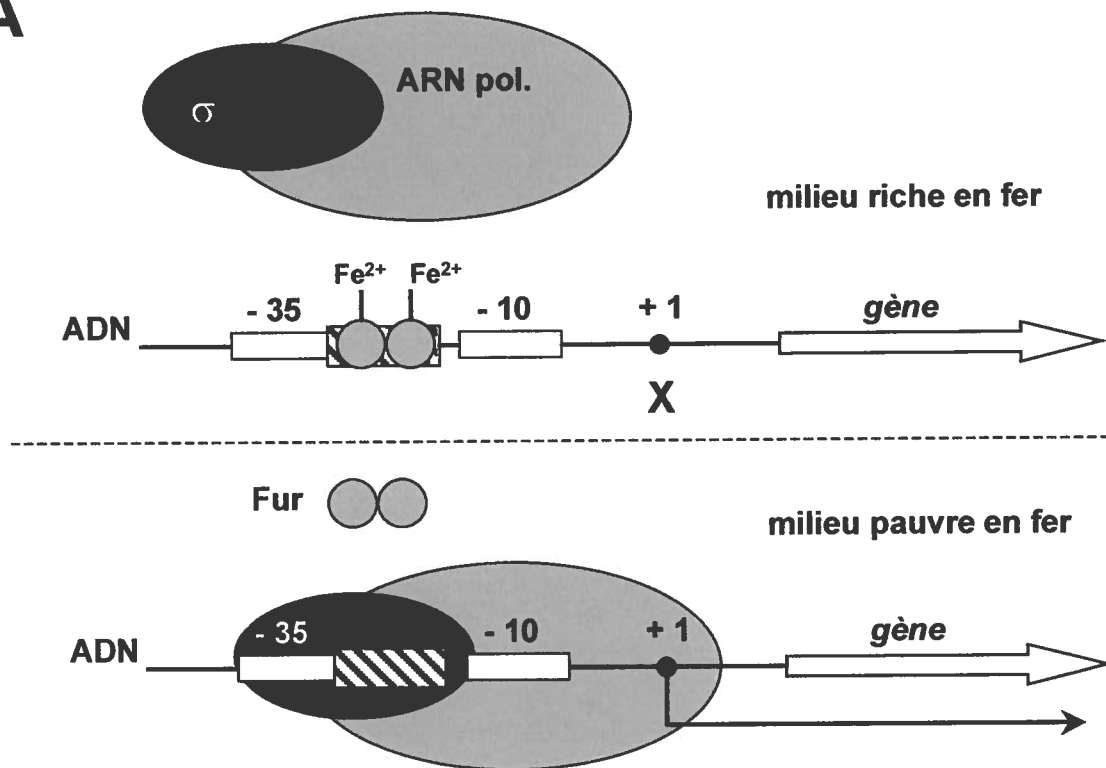
2.3.1 Le répresseur Fur

Le fer est essentiel à la croissance, par contre, un excès de fer dans la cellule est toxique puisque ce métal catalyse la production de radicaux hydroxyles. Il est donc nécessaire que le transport de fer dans la cellule soit étroitement contrôlé, de façon à maintenir la concentration en-dedans des limites acceptables (Escolar *et al.*, 1999). La protéine Fur (ferric uptake regulation) est un répresseur métallo-dépendant qui joue un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer et la virulence (Hantke, 2001). La découverte de mutants de *S. typhimurium* et *E. coli* qui sur-produisent les sidérophores et leurs récepteurs membranaires de façon constitutive (Ernst *et al.*, 1978; Hantke, 1981) a mené à l'identification de l'emplacement du gène *fur* sur le chromosome de *E. coli* (Hantke, 1984; Bagg et Neilands, 1985) et à son clonage (Hantke, 1984). On retrouve des homologues de Fur dans un grand nombre de bactéries Gram-négatives, incluant plusieurs pathogènes humains, dans certaines bactéries Gram-positives avec un faible pourcentage en G et C, et même dans les cyanobactéries (Escolar, 1999). La plupart de ces homologues parviennent à compléter un mutant *fur* de *E. coli* (Escolar, 1999).

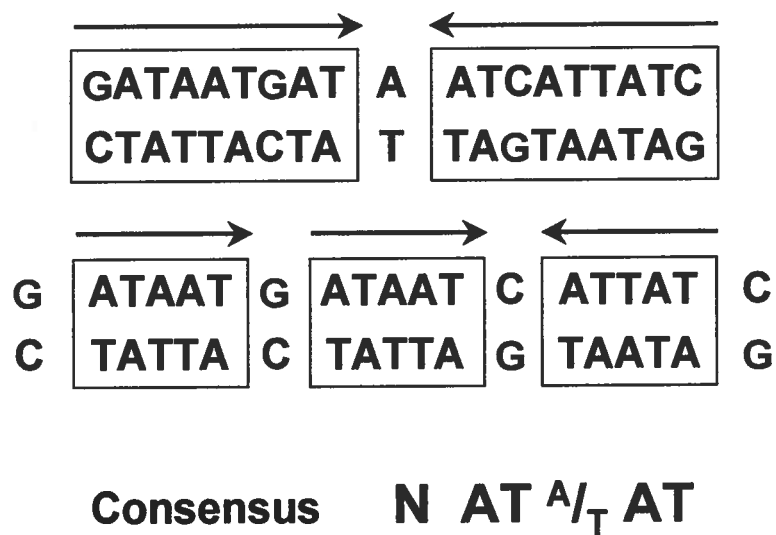
La protéine Fur est un polypeptide de 17 kilodaltons (Saito *et al.*, 1991; Escolar, 1999) qui est présente sous forme dimérique en solution (Wee *et al.*, 1988). Lorsque le fer est abondant dans le milieu, Fur est complexée au fer et peut donc se lier à son opérateur. Ceci empêche la liaison de l'ARN polymérase au promoteur et le gène n'est pas transcrit. En conditions de privation en fer, le répresseur, qui n'est plus complexé au fer, devient inactif. Le répresseur inactif ne peut se lier à l'opérateur, ce qui permet à l'ARN polymérase d'initier la transcription (Escolar *et al.*, 1999). Le mécanisme d'action de Fur est schématisé à la figure 2A.

Figure 2. Mécanisme d'action du répresseur Fur. A) Mode de liaison de Fur à son opérateur. Voir le texte pour la description du mécanisme de liaison. La protéine Fur est représentée sous sa forme dimérique. L'opérateur est représenté par une boîte hachurée. Figure adaptée de Hennecke, 1990. B) Interprétations alternatives de l'opérateur de Fur. La séquence consensus de 19 paires de bases peut être interprétée comme étant un palindrome composé de deux séquences de 9 paires de bases répétées et inversées. Par contre, il est aussi possible d'interpréter cette séquence comme une suite de trois répétitions (deux directes et une inverse) d'une séquence consensus invariable. Figure tirée de Escolar *et al.*, 1999.

A



B



Fur agit principalement en tant que répresseur; par contre certains exemples de régulation positive par Fur ont aussi été documentés. Parmi les gènes régulés positivement, on retrouve *finA* et *bfr* (ferritines), *acnA* (aconitase), *fumA* (fumarase) et le gène *sodB* de *E. coli*, dont le produit est la Fe-SOD (Hantke, 2001). Toutefois, il semble que l'effet positif de Fur sur l'expression de *sodB* serait indirect (Dubrac et Touati, 2002). Une étude récente a permis de démontrer que la régulation positive par Fur est en effet indirecte: celle-ci se produit par l'entremise d'un ARN anti-sense, RyhB, qui empêche la traduction des ARN des gènes mentionnés précédemment lorsque le fer est limitant. L'expression de cet ARN est régulée de façon négative par Fur. La perception de régulation positive par Fur des gènes énumérés plus haut est donc complètement abolie dans un mutant *ryhB* (Masse et Gottesman, 2002).

La protéine Fur semble être abondante par rapport aux autres régulateurs: par exemple, chez *Vibrio cholerae*, on retrouve environ 2500 molécules du répresseur par cellule en phase exponentielle et environ 7500 en phase stationnaire (Watnick *et al.*, 1997). La quantité élevée de cette protéine dans la cellule peut être expliquée en partie par le nombre élevé de gènes faisant partie du régulon Fur (Escolar *et al.*, 1999). En effet, nous connaissons plus de 90 gènes de *E. coli* étant régulés par le fer et par Fur. Parmi ceux-ci, on retrouve une soixantaine de gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport des divers sidérophores, 18 gènes dont les produits sont des protéines cytoplasmiques impliquées dans le métabolisme (incluant certaines protéines essentielles à la réponse au stress oxydatif) et 13 gènes de facteurs de virulence retrouvés dans certaines souches pathogènes de *E. coli* (Hantke, 2001).

L'analyse par empreintes à la DNase I de plusieurs sites de liaison à Fur a permis de définir l'opérateur de Fur, une séquence consensus de 19 paires de bases nommée "Iron box" ou boîte Fur (voir figure 2B) (Escolar *et al.*, 1999). Des expériences ont démontré que lorsqu'elle est clonée en aval d'un promoteur, cette séquence est suffisante pour assurer que la transcription d'un gène soit régulée par le fer (Calderwood et Mekalanos, 1988). La séquence consensus a d'abord été interprétée comme étant un palindrome composé de deux séquences répétées et inversées (de Lorenzo *et al.*, 1987;

Calderwood et Mekalanos, 1987; Pressler *et al.*, 1988). Le fait que la protéine soit présente sous forme dimérique suggère donc un mode d'interaction de type classique pour les promoteurs bactériens, c'est-à-dire un dimère reconnaissant une séquence palindromique (Escolar *et al.*, 1999). Par contre, les empreintes de protection par Fur obtenues avec le promoteur de l'opéron *iucABCDiutA*, codant pour la synthèse et le transport du sidérophore aérobactine, ont révélé que Fur semble s'enrouler autour de l'ADN de manière à former un patron de deux bases protégées séparées de quatre bases non-protégées (de Lorenzo *et al.*, 1988). De plus, l'observation par microscopie électronique de la liaison de Fur à certains promoteurs démontre une polymérisation de la protéine au site de liaison (Frechon et Le Cam, 1994; Le Cam *et al.*, 1994). Finalement, il existe des promoteurs régulés par le fer qui ont plus d'un site de liaison à Fur, dont certains peuvent se chevaucher (de Lorenzo *et al.*, 1987; de Lorenzo *et al.*, 1988; Griggs et Konisky, 1989; Escolar *et al.*, 1999). Ces observations sont incompatibles avec le modèle dimère-palindrome. Il est intéressant de noter que la séquence consensus de 19 paires de bases peut aussi être interprétée comme une combinaison de trois séquences répétées «5' NAT^A/TAT 3'» (Escolar *et al.*, 1999) (voir figure 2B). Cette interprétation du site de liaison de Fur est plus compatible avec les résultats expérimentaux. La vérification expérimentale de cette hypothèse avec des séquences synthétiques a démontré que les sites de liaison fonctionnels de Fur sont composés d'un minimum de trois répétitions d'une séquence de six paires de bases (GATAAT) et non par une séquence palindromique de 19 paires de bases. Des sites de liaison plus longs ont aussi été construits en ajoutant une ou deux répétitions de la même séquence (Escolar *et al.*, 1998). Cette découverte pourrait expliquer le fait que Fur, une protéine relativement simple, peut contrôler plusieurs gènes de façon différente et graduelle: c'est-à-dire que le nombre de répétitions de la séquence pourrait déterminer l'affinité avec laquelle Fur peut se lier à un promoteur (Escolar *et al.*, 1999).

2.3.2 Le répresseur DtxR

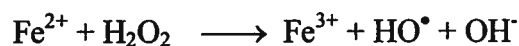
Dans certaines bactéries Gram-positives avec un contenu élevé en G et C, telles que les streptomycètes, les corynébactéries et les mycobactéries, la régulation de

l'acquisition du fer est effectuée par un répresseur autre que Fur (Hantke, 2001). Le premier membre de cette famille de répresseurs, nommé DtxR pour "diphtheria toxin regulator", a été découvert parce qu'il contrôle l'expression d'une toxine produite dans la bactérie pathogène *Corynebacterium diphtheriae*, en réponse à la quantité de fer dans le milieu (Boyd *et al.*, 1990; Hantke, 2001). La séquence de DtxR ne présente pas d'homologies avec celle de Fur et la séquence de liaison de DtxR à l'ADN est différente de celle de Fur (Schmitt *et al.*, 1992; Tao et Murphy, 1994). Par contre, les deux protéines partagent certaines similarités structurales. Par exemple, leurs domaines de liaison à l'ADN comprennent un motif hélice-boucle-hélice et se situent à l'extrémité N-terminale. De plus, chaque protéine possède un second domaine responsable de la dimérisation et de la liaison aux co-facteurs métalliques (Gonzalez de Peredo *et al.*, 2001; Hantke, 2001).

2.4 Relation entre le stress oxydatif et le métabolisme du fer

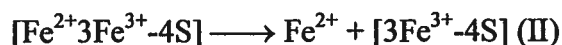
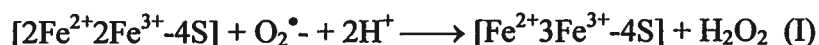
2.4.1 Les causes du stress oxydatif

Le stress oxydatif est causé par l'exposition aux radicaux oxygénés, qui sont des sous-produits du métabolisme aérobie. Parmi ces espèces réactives, on retrouve l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) (Storz et Imlay, 1999; Touati, 2000a; Cabiscol *et al.*, 2000). L'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont formés lors de l'oxydation des transporteurs d'électrons par l'oxygène moléculaire ou par l'auto-oxydation des composantes de la chaîne respiratoire lors de la croissance logarithmique (Storz et Imlay, 1999). L'exposition au peroxyde d'hydrogène inhibe la croissance des microorganismes. Puisque ce produit parvient à oxyder les groupes thiols des protéines, ceci permet de croire qu'il entraîne l'inactivation de certaines enzymes telles la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, impliquée dans la glycolyse (Storz et Imlay, 1999). Le peroxyde d'hydrogène réagit aussi avec le fer libre dans la cellule pour former des radicaux hydroxyles (réaction de Fenton):



Ces radicaux hydroxyles endommagent directement les protéines, les acides nucléiques, et les membranes cellulaires. Puisque le fer a tendance à s'accumuler au niveau des liaisons phosphodiester le long des acides nucléiques, l'ADN est particulièrement vulnérable aux radicaux produits lors de la réaction de Fenton. Il est donc probable que la mort cellulaire entraînée par l'exposition au peroxyde d'hydrogène soit due principalement aux mutations spontanées causées par les lésions formées dans l'ADN (Storz et Imlay, 1999).

L'anion superoxyde n'est pas une molécule particulièrement réactive (Touati, 2000a; Benov, 2001). Par contre, celui-ci entraîne l'oxydation des protéines qui contiennent un centre [4Fe-4S] par le mécanisme suivant:



Ces deux réactions entraînent la production de Fe^{2+} libre et de peroxyde d'hydrogène, qui réagissent pour former des radicaux hydroxyles (réaction de Fenton) (Benov, 2001).

2.4.2 Les mécanismes de détoxification

La concentration de radicaux oxygénés susceptible d'entraîner un stress oxydatif varie d'un organisme à l'autre et dépend des conditions de croissance (Storz et Imlay, 1999). Les bactéries aérobies ont développé diverses stratégies leur permettant de maintenir la concentration des radicaux à des niveaux acceptables et à réparer les dommages causés par le stress oxydatif (Cabiscol *et al.*, 2000).

Dans la bactérie *E. coli*, le peroxyde d'hydrogène est détoxifié en grande partie à l'aide de deux catalases, qui convertissent l' H_2O_2 en H_2O et O_2 . La première catalase, l'hydroperoxydase I, produit du gène *katG*, est présente lors de la phase logarithmique de croissance. La seconde catalase, l'hydroperoxydase II, est le produit du gène *katE* et

celle-ci est présente lors de la phase stationnaire (Schellhorn, et Hassan, 1988; Storz et Imlay, 1999). En temps normal, la présence de ces enzymes permet de maintenir la concentration de peroxyde d'hydrogène dans la cellule entre 10^{-7} et 10^{-6} M, ce qui est en-dessous du seuil de toxicité de 10^{-5} M (Storz et Imlay, 1999).

La détoxification de l'anion superoxyde dans *E. coli* est possible grâce aux superoxyde dismutases (SOD), qui convertissent l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et O_2 (Cabiscol *et al.*, 2000). On retrouve trois SOD dans la bactérie *E. coli*: une Mn-SOD (*sodA*) et une Fe-SOD (*sodB*) se trouvant dans le cytoplasme (Touati, 2000a; Touati, 1983; Sakamoto et Touati, 1984) et une Cu/Zn-SOD (*sodC*) localisée au niveau du périplasma (Imlay et Imlay, 1996). La plupart des bactéries aérobies possèdent soit une Mn-SOD ou une Fe-SOD, tandis que les Cu/Zn-SOD ont été identifiées surtout dans certaines bactéries pathogènes ou endosymbiotiques (Benov, 2001; Merkamm et Guyonvarch, 2001). Lors de la croissance en présence d'oxygène, *E. coli* synthétise assez de molécules de SOD pour maintenir la concentration d'anions superoxyde dans la cellule à environ 10^{-10} M, ce qui représente la moitié de la concentration requise pour inhiber la croissance cellulaire (Storz et Imlay, 1999). Un mutant de *E. coli* dans lequel les gènes codant pour les deux SOD cytoplasmiques ont été inactivées pousse lentement en milieu riche, est hypersensible au paraquat (un générateur d'anions superoxyde intracellulaires) et au peroxyde d'hydrogène et est incapable de croissance aérobie en milieu minimal. Ce défaut de croissance peut toutefois être corrigé en supplémentant le milieu avec les 20 acides aminés (Carlioz et Touati, 1986). Des études subséquentes ont démontré que la plupart des défauts phénotypiques observés dans le double mutant *sodA**sodB* sont reliés à l'inactivation par l'anion superoxyde d'enzymes contenant des centres [4Fe-4S] (Benov, 2001).

Tel que mentionné dans la section précédente, les radicaux hydroxyles endommagent directement les macromolécules. Les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines font donc partie des systèmes secondaires de réponse au stress oxydatif. Dans la bactérie *E. coli*, on retrouve par exemple l'endonucléase IV (*nfo*), l'exonucléase III (*xthA*), l'ADN polymérase I (*polA*), la protéine

RecA (*recA*) et la méthionine sulfoxyde réductase (*msrA*) (Cabiscol *et al.*, 2000; Storz et Imlay, 1999).

2.4.3 La régulation de la réponse au stress oxydatif

En conditions normales de croissance en aérobie, les différentes enzymes anti-oxydantes et de réparation sont exprimées à des niveaux relativement faibles. Par contre, l'expression de ces protéines est induite en réponse à une augmentation de la concentration des différentes espèces réactives (Storz et Imlay, 1999). La réponse des bactéries au stress oxydatif est contrôlée en grande partie par deux facteurs de transcription, soit OxyR et le système SoxRS (Cabiscol *et al.*, 2000).

La protéine OxyR est requise pour l'activation d'un ensemble de gènes impliqués dans la réponse au stress causé par le peroxyde d'hydrogène (Christman *et al.*, 1989; Tao *et al.*, 1989). OxyR est présente sous deux formes: soit oxydée ou réduite. Il a été démontré que, bien que les deux formes se lient aux promoteurs, seule la forme oxydée peut activer la transcription des gènes du régulon (Storz *et al.*, 1990). Le peroxyde d'hydrogène entraîne directement l'activation de la protéine OxyR par formation de ponts disulfures impliquant au moins un résidu cystéine (Kullik *et al.*, 1995; Zheng, *et al.*, 1998; Aslund *et al.*, 1999). OxyR est désactivée par réduction à l'aide de l'enzyme glutarédoxine 1. Il est à noter que l'expression de la glutarédoxine 1 est elle-même induite par OxyR, ce qui permet de dire que OxyR est auto-régulée (Zheng *et al.*, 1998). La forme oxydée de OxyR se lie sous forme de tétramère à un motif composé de quatre éléments de type "ATAGnt" espacés par 10 paires de bases. Le contact avec ces éléments sur l'ADN s'effectue le long de quatre sillons majeurs adjacents et situés sur la même face de l'hélice (Toledano *et al.*, 1994). Le régulon OxyR comprend entre autres les gènes *katG* (hydroperoxydase 1), *ahpCF* (alkyl hydroperoxyde réductase), *grxA* (glutarédoxine 1), *gorA* (glutathione réductase), ainsi que le gène *fur* (répresseur Fur). Par contre, il est à noter que l'expression de certains gènes impliqués dans la résistance au peroxyde d'hydrogène, tels que *katE* et *xthA*, n'est pas régulée par OxyR (Storz et Imlay, 1999).

La régulation d'un ensemble de gènes impliqués dans la réponse au stress causé par l'anion superoxyde s'effectue à l'aide du système de régulation à deux composantes SoxRS. Le processus de régulation par SoxRS se déroule en deux étapes. Premièrement, la protéine SoxR est convertie à une forme active lui permettant d'activer la transcription du gène *soxS*. Ensuite, la protéine SoxS active la transcription des gènes du régulon (Nunoshiba *et al.*, 1992). La protéine SoxR, qui est exprimée de façon constitutive (Pomposiello et Demple, 2001), contient deux centres [2Fe-2S] par dimère (Wu *et al.*, 1995; Hidalgo *et al.*, 1995). L'activation de SoxR est entraînée par l'oxydation de la forme réduite, [2Fe-2S]¹⁺, pour donner la forme [2Fe-2S]²⁺ (Gaudu et Weiss, 1996; Gaudu *et al.*, 1997). L'oxydation des centres Fe-S se produit rapidement suite à l'exposition des cellules à des générateurs d'anions superoxide (Pomposiello et Demple, 2001). La protéine SoxR peut aussi être activée par l'oxyde nitrique (NO) (Nunoshiba *et al.*, 1995). La forme nitrosylée de SoxR est aussi efficace *in vitro* que la forme oxydée pour activer la transcription de *soxS* (Ding et Demple, 2000). Parmi les gènes régulés par les facteurs de transcription SoxRS, on retrouve *sodA* (Mn-SOD), *nfo* (endonucléase IV), *fumC* (iso-enzyme de la fumarase résistante à l'O₂^{•-}), *acnA* (aconitase) et *fur*. Certains enzymes, tels la Fe-SOD (*sodB*) et la Cu/Zn-SOD (*sodC*), qui protègent la cellule contre les dommages causés par l'anion superoxyde ne sont toutefois pas induits par le système SoxRS (Storz et Imlay, 1999).

La transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif peut être affectée par plusieurs facteurs autres que OxyR et SoxRS. Par exemple, l'expression du gène *sodA*, dont le produit est la Mn-SOD est contrôlée par au moins six facteurs de transcription, incluant Fur et les régulateurs ArcAB (aerobic regulation control) et FNR (fumarate nitrate reductase) (Compan et Touati, 1993). Il a aussi été démontré que l'expression de plusieurs gènes du régulon SoxRS est affectée par les facteurs MarA et Rob, qui sont des homologues de SoxS (Jair *et al.*, 1995; Jair *et al.*, 1996).

2.4.4 Le lien étroit entre le métabolisme du fer et le stress oxydatif

Le métabolisme du fer et la réponse au stress oxydatif sont intimement reliés (Touati, 2000b). Tel que mentionné précédemment, le fer réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles, qui endommagent directement les macromolécules. Il est également reconnu qu'un excès d'anions superoxyde dans la cellule entraîne la décomposition des centres Fe-S de certaines protéines, ce qui contribue à faire augmenter la concentration de fer libre dans la cellule. L'analyse d'un mutant *fur* a révélé que les systèmes d'acquisition de fer sont dé-réprimés, ce qui entraîne aussi une augmentation de la quantité de fer libre dans la cellule. Il n'est donc pas surprenant que les mutants *fur* et *sodAsodB* de *E. coli* présentent certains phénotypes similaires, tels une augmentation du taux de mutation spontanée en présence d'oxygène (Touati, 2000b). Le lien entre le fer et le stress oxydatif est renforcé par le fait que certains gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif sont sous le contrôle de Fur ou d'un de ses proches homologues. Par exemple, on sait que l'expression de la Mn-SOD est partiellement régulée par Fur. Il est aussi important de rappeler que le gène *fur* est lui-même activé en réponse au stress oxydatif par l'entremise des activateurs OxyR et SoxRS. Finalement, certaines études ont démontré qu'une combinaison de la mutation *fur* avec des mutations dans les gènes responsables de l'activation de la réponse au stress oxydatif cause un défaut de croissance pour *E. coli*, et que les mutants en question sont plus sensibles au stress oxydatif (Touati, 2000b).

2.5 La famille Nramp et ses homologues bactériens

2.5.1 Nramp1 et la résistance aux pathogènes intra-cellulaires des macrophages

L'étude des mécanismes de résistance de l'hôte contre certaines infections a mené à la caractérisation d'une nouvelle famille de transporteurs. Il y a déjà plusieurs années, l'étude de lignées pures de souris avait permis d'identifier des lignées résistantes ou susceptibles aux infections causées par *S. typhimurium*, un pathogène intra-cellulaire des

macrophages. Des souches résistantes ou sensibles à d'autres pathogènes intra-cellulaires non-apparentés, *Leishmania donovani* et certaines souches de mycobactéries, avaient aussi été identifiées (Gruenheid et Gros, 2000). Dans tous les cas, la résistance à ces pathogènes se comporte comme un trait dominant encodé par un gène unique, nommé *Bcg*, *Ity* ou *Lsh*. La cartographie préliminaire a permis de situer ce gène sur la région proximale du chromosome 1 de la souris (Buschman et Skamene, 2001). Le gène en question a été identifié par clonage positionnel et fut nommé *Nramp1* pour "Natural resistance-associated macrophage protein 1" (Vidal *et al.*, 1993). L'homologue de ce gène chez l'humain, NRAMP1, a été cloné peu de temps après (Cellier *et al.*, 1994). Le séquençage de *Nramp1* a permis de prédire que le produit de ce gène est une protéine intégrale de la membrane comportant 12 segments transmembranaires (Vidal *et al.*, 1993; Cellier *et al.*, 1994). Le gène *Nramp1* est exprimé uniquement dans les phagocytes professionnels de la lignée myéloïde (Govoni *et al.*, 1997). Le séquençage du gène dans les souris résistantes et sensibles aux infections a démontré que la susceptibilité est associée avec une seule substitution d'acide aminé dans le quatrième segment transmembranaire prédit (Malo *et al.*, 1994). Cette mutation empêcherait la protéine de se replier correctement, ou encore d'être acheminée correctement à la membrane, ce qui expliquerait pourquoi on ne détecte pas de protéine *Nramp1* mature dans les macrophages de souris susceptibles (Vidal *et al.*, 1996).

Les études de localisation de la protéine *Nramp1* ont démontré que celle-ci est exprimée lors d'une étape tardive dans la formation des compartiments endosomaux des macrophages, et qu'elle est rapidement recrutée à la membrane des phagosomes contenant des pathogènes intra-cellulaires (Gruenheid *et al.*, 1997). Ces observations ont suggéré que *Nramp1* était peut-être un transporteur permettant de modifier le contenu de l'espace phagosomal (Gruenheid *et al.*, 1997). La découverte de protéines homologues à *Nramp1* et l'étude de leur fonction ont permis de suggérer que *Nramp1* est un transporteur de métaux divalents dépendant du proton (Forbes et Gros, 2001). Le rôle de *Nramp1* dans le transport des métaux a été étudié par différentes méthodes. Les résultats obtenus par un groupe suggéraient que *Nramp1* transporte le fer vers l'intérieur des phagosomes, permettant ainsi de contrôler la répllication des bactéries ingérées en

augmentant la production de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (Kuhn *et al.*, 1999). Cependant, l'étude présente certaines lacunes et le modèle impliquerait que Nramp1 transporte les métaux dans le sens opposé à Nramp2, une protéine hautement homologue dont la fonction a été étudiée plus en détail (Forbes et Gros, 2001). Dans une étude plus sophistiquée, une molécule fluorescente, dont l'intensité est atténuée par la présence de métaux divalents, a été couplée à des particules de zymosan phagocytées par des macrophages. Les résultats de cette étude ont permis de démontrer le transport d'ions Mn^{2+} dépendant du gradient de pH vers l'extérieur du phagosome (Jabado *et al.*, 2000). Cette direction de transport est en accord avec l'orientation proposée de la protéine dans la membrane.

2.5.2 Nramp2 et les autres membres de la famille Nramp retrouvés chez les eucaryotes

Peu de temps après la découverte de *Nramp1*, un proche homologue de ce gène a été identifié chez la souris et chez le rat (Gruenheid *et al.*, 1995; Gunshin *et al.*, 1997). Le produit du gène, Nramp2 (aussi nommé DCT1 ou DMT1), démontre environ 63% d'identité en acides aminés par rapport à la protéine Nramp1 (Gruenheid *et al.*, 1995). La protéine Nramp2 est la mieux caractérisée de la famille NRAMP jusqu'à présent. L'expression de DCT1 dans les oeufs de Xénope a permis de démontrer que cette protéine transporte les métaux divalents suivants: Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} et Pb^{2+} , et que le transport est dépendant du proton (Gunshin *et al.*, 1997). C'est cette première caractérisation fonctionnelle d'un homologue NRAMP qui a permis de proposer que les membres de cette famille sont des transporteurs de métaux divalents (Gunshin *et al.*, 1997).

Contrairement à *Nramp1* qui est exprimé exclusivement dans les phagocytes professionnels, *Nramp2* est exprimé de façon ubiquitaire. L'ARNm est exprimé à de faibles niveaux dans plusieurs tissus et son expression est plus élevée au niveau des reins et de la partie proximale du duodénum. La transcription de *Nramp2* augmente sensiblement en réponse à la privation en fer (Gruenheid *et al.*, 1995; Gunshin *et al.*,

1997). Une mutation identique située dans le quatrième segment transmembranaire de Nramp2 chez les rats et les souris entraîne une anémie microcytique sévère associée avec un défaut d'absorption du fer au niveau de l'intestin et des tissus périphériques (Fleming *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 1998). Les résultats d'études de localisation du transporteur Nramp2 ont permis d'établir que celui-ci est le principal système d'acquisition du fer indépendant de la transferrine dans l'intestin (Cannone-Hergaux *et al.*, 1999). De plus, la co-localisation de Nramp2 avec la transferrine dans les endosomes de recyclage suggère que Nramp2 serait aussi responsable du transport de Fe^{2+} de l'intérieur des endosomes vers le cytoplasme (Gruenheid *et al.*, 1999).

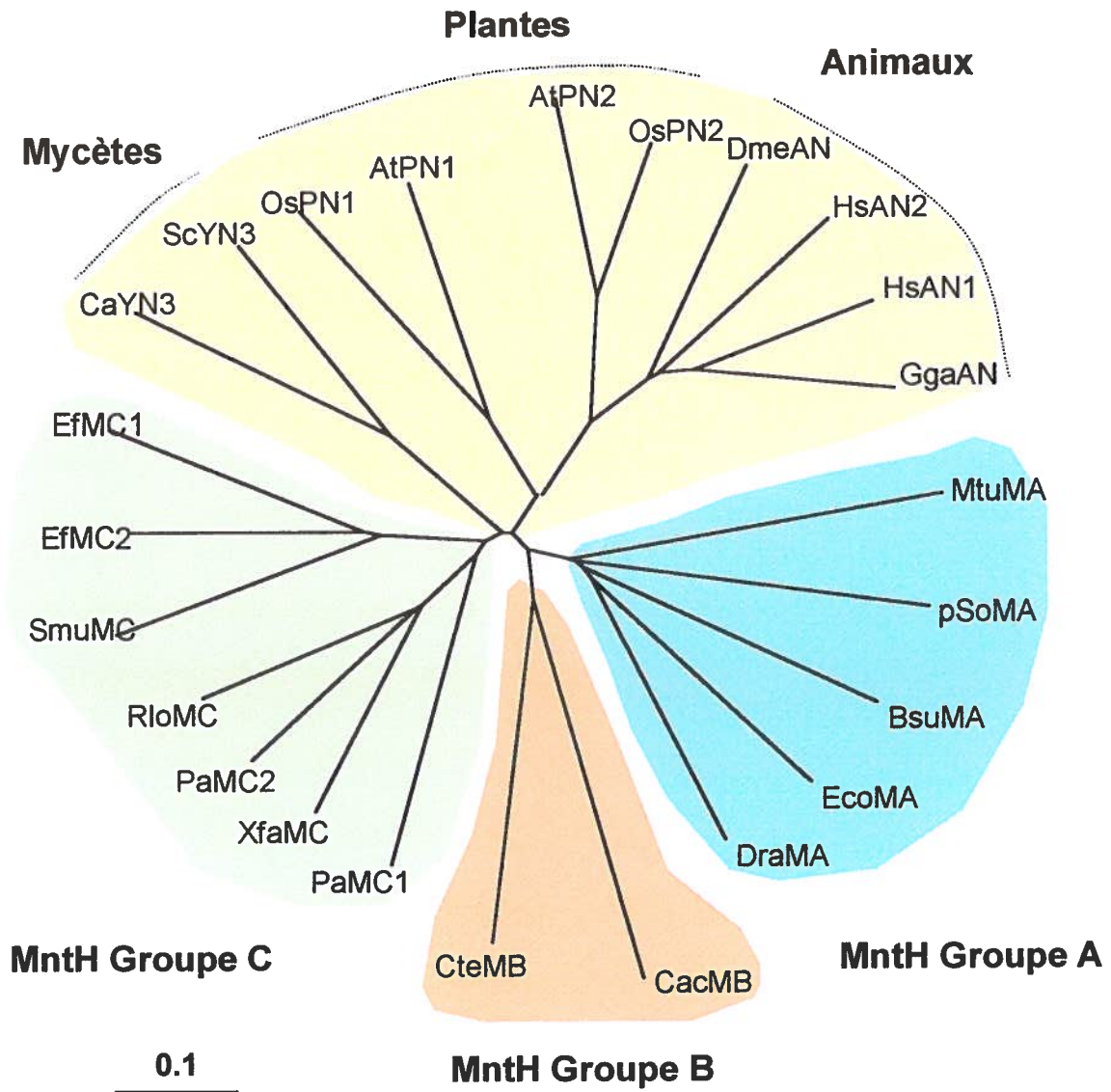
Chez les eucaryotes, on retrouve des homologues NRAMP dans les mammifères, les oiseaux, les insectes, les plantes, les poissons et les levures (Forbes et Gros, 2001). La présence de 12 segments transmembranaires et de plusieurs résidus chargés invariables dans 6 des 10 segments transmembranaires constituant le coeur hydrophobe sont des caractéristiques hautement conservées parmi les membres de la famille (Cellier *et al.*, 1995). Des études de complémentation ont démontré que la similarité structurale est accompagnée d'une conservation fonctionnelle. Par exemple, des mutations dans le gène *malvolio*, le membre de la famille NRAMP retrouvé chez la mouche *Drosophila melanogaster*, causent un défaut d'ordre gustatif (Rodrigues *et al.*, 1995). Ce défaut peut être corrigé par supplémentation de la diète en Fe^{2+} ou Mn^{2+} , ou par l'expression du gène *NRAMP1* humain dans la mouche (Orgad *et al.*, 1998; D'Souza *et al.*, 1999). La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède trois homologues NRAMP nommés SMF1, SMF2 et SMF3. Les trois protéines sont impliquées dans le transport des métaux divalents (Portnoy *et al.*, 2000). Le défaut de croissance en présence de chélateurs de métaux d'un mutant *smf1/smf2* est complétement par l'expression du gène *Nramp2* (Pinner *et al.*, 1997). Finalement, le défaut de transport de métaux d'un mutant *smf1* est complétement par l'expression de certains des homologues NRAMP de la plante *Arabidopsis thaliana* (Thomine *et al.*, 2000).

2.5.3 La famille MntH: homologues Nramp bactériens

Les projets de séquençage des génomes microbiens ont révélé la présence d'homologues Nramp dans plusieurs bactéries (Cellier *et al.*, 2001). Ces homologues ont été nommés MntH pour « Proton-dependent Manganese Transporter », d'après la fonction des transporteurs de *E. coli* et *B. subtilis* (Makui *et al.*, 2000; Que et Helmann, 2000). Les homologues Nramp ont été identifiés dans 15 genres bactériens, ce qui suggère que la famille est apparue relativement tôt au cours de l'évolution. Des alignements de séquences en acides aminés ont permis de diviser les homologues Nramp bactériens en trois groupes : A, B et C (Cellier *et al.*, 2001) (voir figure 3). Les séquences du groupe A sont retrouvées autant dans des espèces Gram-positives et Gram-négatives que dans le groupe plus ancien *Thermus/Deinococcus*. Les protéines du groupe A étudiées jusqu'à présent transportent le manganèse. Il est donc possible que les gènes du groupe A aient évolué parce que le métabolisme aérobie aurait favorisé le transport de manganèse pour augmenter la résistance au stress oxydatif. Ce groupe serait donc apparu chez des espèces aérobies facultatives (Cellier *et al.*, 2001). Le groupe B a une origine unique près de la base de l'arbre phylogénique de la famille Nramp. Ce groupe, dont les membres transportent possiblement le fer, comprend jusqu'à présent des séquences appartenant à des espèces anaérobies. La présence d'un gène du groupe B dans *Chlorobium tepidum*, une espèce bactérienne exerçant un type de proto-photosynthèse anoxygénique, suggère que l'apparition du groupe B aurait eu lieu avant l'évolution des métabolismes aérobies. Les gènes appartenant à ce groupe représenteraient donc les plus proches descendants de l'ancêtre MntH (Cellier *et al.*, 2001). Le groupe C comprend des séquences retrouvées principalement dans des espèces capables d'infecter un hôte animal ou végétal. Certains MntH du groupe C ressemblent plus aux protéines Nramp des eucaryotes qu'aux MntH des deux autres groupes, ce qui suggère un ancêtre commun pour ces deux groupes. Ceci soulève la possibilité que les gènes auraient été acquis par transfert horizontal à partir d'un hôte (Cellier *et al.*, 2001).

Figure 3. Analyse évolutive de la famille MntH/Nramp. L'alignement de séquences en acides aminés a permis de diviser les protéines MntH bactériennes en trois groupes statistiquement différents, soit les groupes A, B et C. La longueur des branches indique la distance évolutive entre les séquences. L'échelle représente un remplacement de 0,1 acide aminé par site. Les noms des protéines sont composés de l'initiale du genre suivie d'une ou deux lettres du nom de l'espèce*, et de lettres identifiant le groupe : MA = MntH Groupe A, MB = MntH Groupe B, MC = MntH Groupe C, YN = Nramp de levure, PN = Nramp de plante, AN = Nramp d'animal. Des chiffres ont été ajoutés lorsqu'une espèce possède plus d'un gène de cette famille. * *Candida albicans* (Ca), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Homo sapiens* (Hs), *Gallus gallus* (Gga), *Mycobacterium tuberculosis* (Mtu), plasmide pSOL1 de *Clostridium acetobutylicum* (pSo), *Bacillus subtilis* (Bsu), *Escherichia coli* (Eco), *Deinococcus radiodurans* (Dra), *Chlorobium tepidum* (Cte), *Clostridium acetobutylicum* (Cac), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Xylella fastidiosa* (Xfa), *Rhizobium loti* (Rlo), *Streptococcus mutans* (Smu), *Enterococcus faecalis* (Ef).
Figure tirée de Cellier et al., 2001.

Nramp eucaryotes



L'hypothèse qui a été retenue pour expliquer l'évolution de la famille Nramp est celle qui suppose la séquence d'événements la plus simple, c'est-à-dire qu'elle implique le moins possible d'événements rares telles la perte de gènes et les duplications (Cellier *et al.*, 2001):

1. Le groupe B serait apparu en conditions d'anaérobie, avant l'utilisation catalytique du manganèse par les cyanobactéries lors de la photosynthèse oxygénique.
2. Les gènes du groupe A seraient apparus sous la pression de la toxicité causée par l'oxygène. Il y aurait eu sélection pour des protéines avec une affinité plus élevée pour le manganèse.
3. Les gènes du groupe A seraient les ancêtres des Nramp eucaryotes: ils auraient été transférés aux cellules eucaryotes par l'ancêtre de la mitochondrie.
4. Un pathogène opportuniste exposé à l'ADN et compétent pour la transformation aurait capté un gène codant pour un transporteur résistant au stress oxydatif pour son propre avantage lors de l'infection. Cette événement serait à l'origine du groupe C.

2.5.4 Rôle des MntH du groupe A dans le transport du manganèse

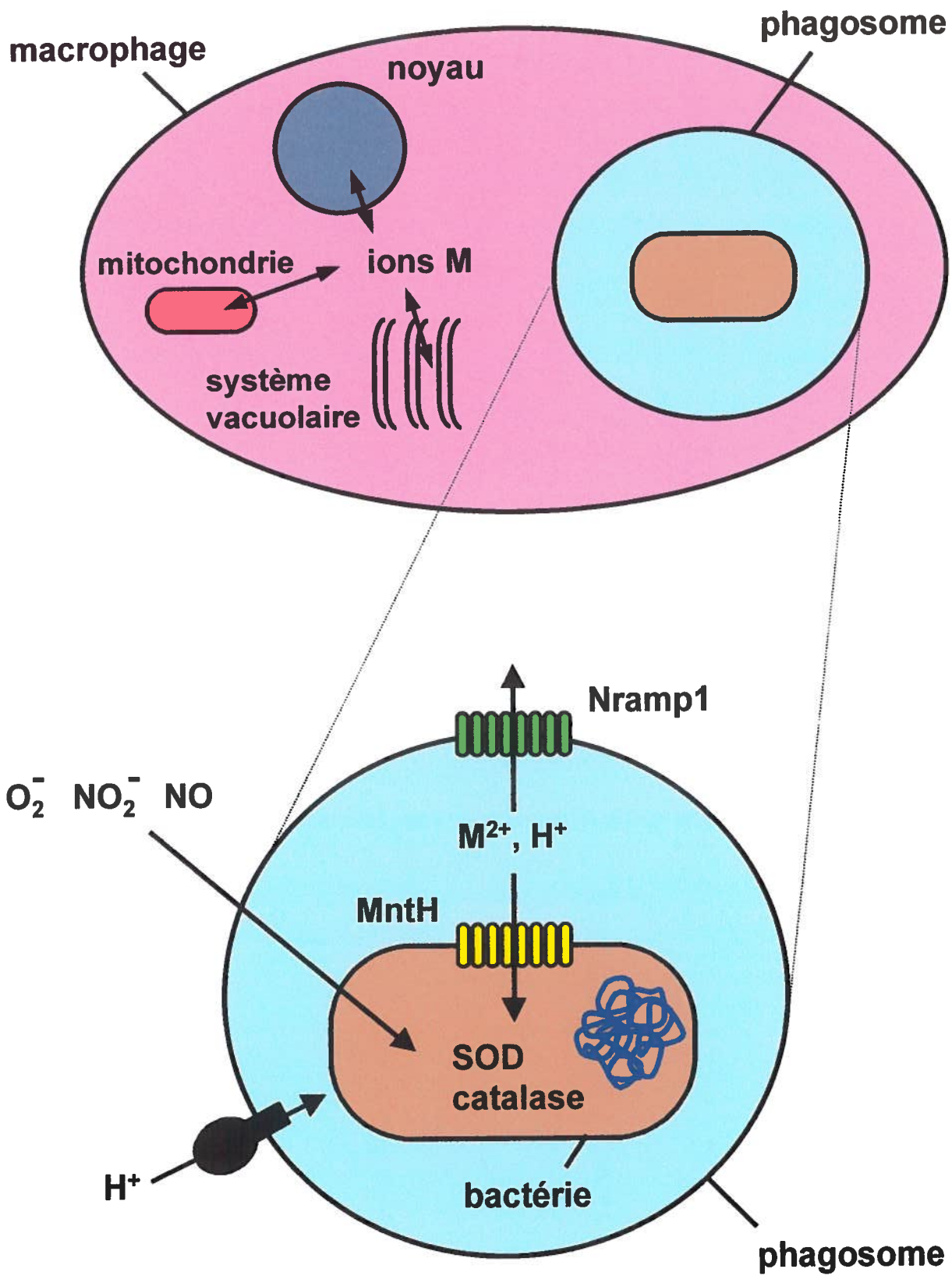
Les seuls transporteurs MntH étudiés jusqu'à présent appartiennent au groupe A. Afin de vérifier la fonction des gènes *mntH* dans les bactéries, une souche $\Delta mntH$ de *E. coli* a été créée dans le laboratoire du Dr. Cellier. Toutefois, l'interruption du gène *mntH* n'entraîne pas de phénotype anormal pour la bactérie lors de la croissance en milieu riche ou en milieu minimal, ce qui a compliqué la découverte d'une fonction associée au gène (Makui *et al.*, 2000). Puisque le rôle de certains membres de la famille Nramp dans le transport des métaux divalents était déjà connue, il était important d'étudier le rôle possible de la protéine MntH de *E. coli* (MntH_{Ec}) dans le transport des métaux. Le gène *mntH* a donc été étudié dans le mutant *hflB*(Ts), qui requiert de hautes concentrations de Fe²⁺ ou autres métaux divalents pour survivre à 42°C (Makui *et al.*, 2000). L'interruption du gène *mntH* dans la souche *hflB*(Ts) affecte la capacité de certains métaux divalents à restaurer la croissance à 42°C (Makui *et al.*, 2000). Inversément, la sur-expression du gène *mntH* à partir d'un plasmide inductible permet de rétablir la croissance à 42 °C, d'augmenter la capacité du Fe²⁺ et du Ni²⁺ à compléter la croissance et rend la souche

hflB(Ts)ΔmntH hyper-sensible au manganèse (Makui *et al.*, 2000). Les études de transport de métaux ont démontré que MntH_{Ec} transporte le manganèse de façon préférentielle. Les expériences de compétition démontrent que MntH_{Ec} a plusieurs substrats et des tests de toxicité avec différents métaux divalents ont permis de déterminer l'ordre de préférence suivant: $Mn^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+}$ (Makui *et al.*, 2000). MntH_{Ec} est le premier transporteur de manganèse identifié chez *E. coli* et les expériences de transport semblent indiquer qu'il est unique. Les études effectuées sur les protéines MntH de *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhimurium* ont démontré que celles-ci transportent aussi les cations divalents, et plus particulièrement, le manganèse (Que et Helmann, 2000; Kehres *et al.*, 2000).

2.5.5 Le rôle de la famille Nramp dans les relations hôte-pathogène

L'hypothèse suivante a été avancée pour tenter d'expliquer l'interaction entre Nramp et ses homologues bactériens lors des relations pathogène-macrophage (Nelson, 1999). Comme toute autre cellule vivante, le macrophage a besoin de métaux divalents pour remplir plusieurs fonctions. Dans le contexte d'une infection intra-cellulaire, le macrophage se sert d'enzymes telles la NADPH oxydase et la NO-synthétase inductible pour produire des radicaux oxygénés et azotés avec lesquels il bombarde les bactéries ingérées (Segal et Abo, 1993; MacMicking *et al.*, 1997). De son côté, la bactérie produit des métallo-enzymes, telles la superoxyde dismutase et la catalase, afin de se protéger contre les dommages causés par les radicaux. La bactérie pourrait utiliser le transporteur MntH pour combler ses besoins en ions divalents. En revanche, le macrophage utilise Nramp pour priver les bactéries phagocytées des ions qui leur sont nécessaires. La bactérie et son hôte utiliseraient donc des protéines homologues pour s'approprier les mêmes ressources. Ce modèle est illustré à la figure 4.

Figure 4. Modèle proposé pour expliquer le rôle de la famille Nramp dans les relations hôte-pathogène. Les macrophages et les bactéries ingérées se servent de protéines homologues pour l'acquisition d'ions métalliques nécessaires à leur survie. Voir le texte les explications détaillées. Figure adaptée de Nelson, 1999.



2.6 Importance du manganèse pour la croissance et la virulence

Le manganèse est un micro-nutriment nécessaire à la survie des bactéries. Contrairement au fer, celui-ci est très soluble et ne catalyse pas la formation de radicaux hydroxyles. On le retrouve dans certaines métallo-enzymes impliquées dans des voies métaboliques essentielles (Jakubovics et Jenkinson, 2001). Chez les cyanobactéries, le processus de photosynthèse oxygénique requiert un groupe de quatre ions Mn présents dans le centre réactionnel du photosystème II (Bartsevich et Pakrasi, 1995). Chez certaines bactéries Gram-positives formant des endospores, l'enzyme 3-phosphoglycérate mutase, impliquée dans la glycolyse, est active seulement lorsqu'elle est associée avec le manganèse (Chander *et al.*, 1998). Malgré sa présence dans plusieurs enzymes, on associe surtout le manganèse à la détoxification des radicaux oxygénés, puisqu'il sert de cofacteur à la Mn-SOD.

Dans la majorité des cas, des concentrations environnementales de Mn inférieures à 1 nM sont suffisantes pour subvenir aux besoins des bactéries (Archibald, 1986). Par contre, certaines espèces dépendent du manganèse pour la croissance, et donc requièrent des concentrations beaucoup plus élevées dans le milieu. Parmi celles-ci, on retrouve des espèces du genre *Lactobacillus* qui ont substitué le Fe pour le Mn dans plusieurs enzymes, telles la Mn-catalase (Archibald, 1986; Imbert et Blondeau, 1998). De plus, ces bactéries, qui ne possèdent pas de Mn-SOD, sur-accumulent le Mn à des concentrations de l'ordre du millimolaire et se servent de cet ion pour détoxifier directement les anions superoxydes (Archibald, 1986). Chez la bactérie Gram-positive *Bacillus subtilis*, le manganèse est essentiel au processus de sporulation (Jakubovics et Jenkinson, 2001; Que et Helmann, 2000). Il existe des pathogènes qui semblent avoir réussi à contourner certaines défenses de l'hôte en remplaçant le fer pour le manganèse dans plusieurs enzymes. Par exemple, la croissance de la bactérie *Borrelia burgdorferi*, qui cause la maladie de Lyme, n'est pas affectée par l'absence de fer dans le milieu. Par contre, la présence de manganèse est essentielle à la croissance de cet organisme (Posey et Gherardini, 2000). D'autres pathogènes tels *Streptococcus suis* (méningite porcine) (Niven *et al.*, 1999), et *Treponema pallidum* (syphilis) (Posey *et al.*, 1999) sembleraient

aussi tirer avantage de l'utilisation préférentielle de Mn pour lequel la compétition avec l'hôte est moindre qu'avec le fer.

2.7 Les autres transporteurs de manganèse retrouvés dans les bactéries

Jusqu'à présent, trois familles de transporteurs de manganèse ont été identifiées : les ATPases de type P, les transporteurs de type ABC et le groupe MntH (Jakubovics et Jenkinson, 2001). Le premier transporteur de manganèse identifié chez une bactérie est MntABC, un transporteur de type ABC retrouvé chez la cyanobactérie *Synechocystis*, espèce PCC 6803. Une mutation dans le gène MntA a été associée avec l'incapacité d'un mutant à effectuer la photosynthèse (Bartsevich et Pakrasi, 1995). De plus, l'inactivation de l'opéron entraîne un défaut de croissance lorsque le milieu est pauvre en Mn (Bartsevich et Pakrasi, 1996). Chez la bactérie *Streptococcus pneumoniae* les gènes *psaA* et *psaD* codent pour des composantes du transporteur de Mn de type ABC. L'inactivation de ces gènes entraîne une sensibilité au stress oxydatif (Tseng *et al.*, 2002). Les mutants *psaA*, ainsi que des mutants *psaB*, *psaC* et *psaD* sont résistants à la pénicilline, ont un défaut d'adhésion et ont une efficacité de transformation réduite. L'addition de Mn ne corrige pas ces défauts de physiologie, ce qui suggère que le transporteur de Mn de type ABC a des effets pléiotropiques sur la physiologie de la bactérie (Novak *et al.*, 1998). Le transporteur de Mn de type ABC de *Yersinia pestis* est le produit de l'opéron *yfeABCD*. Une mutation dans les gènes *yfeAB* entraîne une réduction dans le transport de Fe et de Mn et cette souche est moins virulente que la souche originelle dans un modèle d'infection sous-cutanée de souris (Bearden et Perry, 1999). Finalement, le produit du gène *mntA* de *Lactobacillus plantarum* est un transporteur de Mn et Cd à haute affinité appartenant à la famille des ATPases de type P (Hao *et al.*, 1999).

Certaines bactéries possèdent plus d'un transporteur de manganèse (Cellier, 2001). Par exemple, la bactérie *Bacillus subtilis* possède un transporteur MntH de groupe A ainsi qu'un transporteur de type ABC (MntABCD). Les études sur ces transporteurs suggèrent aussi l'existence d'un troisième système de transport de Mn à haute affinité

chez *B. subtilis*. Un mutant *mntA* présente un défaut de sporulation qui serait attribuable à un excès de manganèse causé par la dé-répression du gène *mntH* (Que et Helmann, 2000). Ceci suggère une influence réciproque des transporteurs de manganèse sur la régulation de leur expression. La bactérie pathogène *Salmonella enterica*, sérovar Typhimurium possède aussi deux transporteurs de manganèse: un transporteur MntH de groupe A et un transporteur de type ABC (SitABCD). Dans cette espèce, il est nécessaire d'inactiver à la fois *mntH* et l'opéron *sit* pour éliminer le transport de Mn et donc de voir une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif par rapport à la souche originelle. De plus, le double mutant a un défaut de croissance en milieu riche en présence du chélateur de métaux 2,2'-dipyridyl (DP). Finalement, le double mutant *mntHsit* est atténué *in vivo* et présente un défaut de croissance intra-cellulaire dans les macrophages lorsque les cellules sont incubées en présence de DP (Boyer *et al.*, 2002). Contrairement à la souche *E. coli* K-12, la souche de *E. coli* uropathogène CFT073 possède un homologue de l'opéron *sitABCD* de *S. typhimurium* en plus de son gène *mntH* (Entrez microbial genomes: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/PMGifs/Genomes/micr.html>; Welch *et al.*, 2002). On ne retrouve toutefois pas d'homologues de l'opéron *sit* dans le génome de toutes les souches pathogènes de *E. coli*, puisque la souche entérohémorragique O157:H7 n'en possède pas (Entrez microbial genomes: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/PMGifs/Genomes/micr.html>; Hayashi *et al.*, 2001). La présence de plus d'un transporteur de manganèse dans certaines espèces souligne l'importance de cet ion dans la physiologie bactérienne. De plus, l'origine de ces transporteurs chez les bactéries, c'est-à-dire leur acquisition par transfert horizontal ou vertical, offre aussi certains indices sur l'importance de l'ion transporté. Les souches de *E. coli* K-12 et CFT073 sont très semblables sur le plan physiologique, toutefois la capacité de la souche pathogène à coloniser d'autres niches résulte de l'acquisition de plusieurs fonctions dont des transporteurs de métaux additionnels.

2.8 La régulation du transport de manganèse dans les bactéries

Des études sur la régulation des gènes *mntH* de *B. subtilis* et de *S. typhimurium* ont été publiées peu de temps après que nous ayons débuté notre étude sur la régulation

du gène *mntH* de *E. coli*. Chez *B. subtilis*, on retrouve un facteur de transcription nommé MntR. Cette protéine est un homologue du répresseur DtxR. Une souche $\Delta mntR$ est sensible au manganèse et au cadmium, ce qui indique que le transport de ces métaux est normalement sous le contrôle de MntR. En effet, MntR réprime la transcription de *mntH* en présence de hautes concentrations de Mn^{2+} , et la sensibilité au Mn^{2+} du mutant *mntR* est partiellement corrigée lorsque le gène *mntH* est muté. Ce facteur de transcription agit aussi en tant qu'activateur de l'opéron *mntABCD* de *B. subtilis* en conditions de privation en Mn^{2+} . Les études de liaison de MntR aux promoteurs des deux gènes démontrent que l'interaction de MntR avec le promoteur de *mntH* est dépendante du Mn^{2+} , tandis que la liaison au promoteur de l'opéron *mntABCD* ne requiert pas la présence de manganèse (Que et Helmann, 2000). Des expériences préliminaires sur la régulation du gène *mntH* de *S. typhimurium* démontrent une forte induction du gène en présence de H_2O_2 (Kehres *et al.*, 2000). Les auteurs ont aussi observé une induction plus faible en présence d'EDTA, un chélateur de métaux divalents. Finalement le même groupe a aussi observé une augmentation de l'expression du gène *mntH* dans les bactéries intra-cellulaires trois heures après l'infection de macrophages.

La régulation de l'expression de certains gènes codant pour les transporteurs de manganèse de type ABC a aussi été étudiée. L'opéron *yfeABCD* de *Y. pestis* est régulé par le fer et par Fur (Bearden et Perry, 1999). L'expression de cet opéron est aussi réprimée en présence de manganèse et cette répression requiert une protéine Fur fonctionnelle (Bearden *et al.*, 1998). Chez *Streptococcus gordonii*, la transcription de l'opéron *scaCBA* augmente lorsque la concentration de manganèse est limitante. De plus, on retrouve dans cette espèce un régulateur Mn-dépendant, ScaR, qui est un homologue du facteur MntR de *B. subtilis*. L'opéron *sca* est dé-réprimé de façon constitutive dans un mutant ScaR (Jakubovics *et al.*, 2000). Finalement, la protéine TroR du pathogène *Treponema pallidum* est un autre homologue de MntR. Ce facteur de transcription est seulement actif en présence de manganèse et il se fixe au promoteur de l'opéron *tro*, dont le produit est le transporteur de Mn de type ABC de cette espèce (Posey *et al.*, 1999).

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souches bactériennes et milieux de culture

Toutes les souches bactériennes utilisées lors de cette étude sont décrites dans le tableau 1. Les cultures en milieu riche ont été effectuées dans du milieu Luria-Bertani (LB) à faible teneur en NaCl (5 g/L) (Miller, 1992), avec 15 g/L d'agar pour le milieu solide ou 7 g/L d'agar pour l'agar mou utilisé lors des tests de sensibilité au stress oxydatif. Les milieux ont été supplémentés avec les antibiotiques suivants lorsque nécessaire : ampicilline (100 µg/ml), kanamycine (30 µg/ml), spectinomycine (50 µg/ml) ou chloramphénicol (20 µg/ml). Le milieu « R agar » a été utilisé lors de la préparation de lysats (Miller, 1992). Celui-ci contient 10 g/L de Tryptone, 1 g/L d'extrait de levure, 12 g/L d'agar (ou 8 g/L pour le milieu mou), 8 g/L de NaCl, du CaCl₂ à une concentration finale de 2 mM et du glucose à 0,1%. Le milieu utilisé pour les cultures en milieu minimal riche en fer est une adaptation par Makui *et al.* (2000) du milieu décrit par Neidhardt *et al.* (1974). Ce milieu, désigné G/M, a été préparé à partir d'une solution de départ 10X congelée à laquelle le Na-β-glycérophosphate, le glycérol, l'acide nitrilotriacétique (NTA, en solutions 1000X) et le FeSO₄ (en solutions fraîches de 1000X diluées dans du HCl 0,1 N) ont été ajoutés. La composition finale du milieu G/M riche en fer est la suivante : 40 mM tampon MOPS (pH 7,4), 9,5 mM NH₄Cl, 0,276 mM K₂SO₄, 0,5 µM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 5 mM Na-β-glycérophosphate, 0,2% glycérol, 100 µM NTA et 10 µM FeSO₄. Dans le cas des milieux avec différentes concentrations de fer, la quantité de NTA utilisée était toujours équivalente à 10 fois la concentration de fer dans le milieu. Le milieu avec micro-éléments contient les éléments suivants : 3 x 10⁻¹⁰ M (NH₄)₆(Mo₇)₂₄, 4 x 10⁻⁸ M H₃BO₄, 3 x 10⁻⁹ M CoCl₂, 1 x 10⁻⁹ M CuSO₄, 1 x 10⁻⁹ M ZnSO₄ et 5 x 10⁻⁶ M MnCl₂. Toutes les cultures ont été incubées à 37°C avec agitation à 250 rpm, à moins d'indication contraire. Les densités optiques à 600 nm (DO₆₀₀) des cultures bactériennes ont été mesurées à l'aide d'un des appareils suivants, selon la disponibilité : « Biochrom Ultrospec 1000 UV/Visible Spectrophotometer » (Biochrom, Ltd., Cambridge, R.-U.), « Milton Roy Spectronic 1201 » (Milton Roy Company, Pont-St-Pierre, France) ou « Pharmacia LKB Ultrospec III » (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Les cultures ont été diluées au 1/10 pour les mesures de densité optique lorsque leur DO₆₀₀ était égale ou supérieure à 1,0.

Tableau 1. Souches bactériennes et plasmides

Bactérie ou plasmide	Génotype ou caractéristiques	Dérivation	Source ou références
Souches de <i>E. coli</i>			
MG1655 (K-12)	F ⁻ λ ⁻ <i>rph-1</i>		Blattner <i>et al.</i> , 1997
EMG2 (K-12)	Même que <i>E. coli</i> K-12 MG1655 mais (F ⁺ λ ⁺) prototrophe		Link <i>et al.</i> , 1997
DH1	F ⁺ <i>glnV44 recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi1 hsdR17(τ_K⁻ m_K⁺) relA1 spoT1 ? rfbD1 ?</i>		Berlyn et Letovsky, 1992
DH11S	<i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i>) Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>recA1398</i>) <i>deoR supE rpsL srl thi^r /F⁺ proAB⁺ lacI^qZΔM15</i>		Lin, J.J., <i>et al.</i> , 1992
GC4468	F ⁻ Δ(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL</i>		Carlioz et Touati, 1986
422	EMG2 Δ <i>mntH</i> : : <i>kan</i>		Makui <i>et al.</i> , 2000
QC1732	GC4468 Δ <i>fur</i> : : <i>kan</i>		Compan et Touati, 1993
QC1799	GC4468 Δ <i>sodA3</i> φ(<i>sodB-kan</i>)Δ2		Touati <i>et al.</i> , 1995
QC2413	MG1655 <i>oxyR::kan</i>		D. Touati
QC2517	MG1655 <i>recD1901</i> : :Tn10 Δ <i>fur</i> : : <i>cat</i>		Dubrac et Touati, 2000
PmntH	EMG2 <i>PmntH-luc</i>		Cette étude
<i>fur</i>	EMG2 Δ <i>fur</i> : : <i>kan</i>	P1Cm-Ts(QC1732) x EMG2	Cette étude
PmntH <i>fur</i> ou PmntH <i>fur::kan</i>	EMG2 <i>PmntH-luc</i> Δ <i>fur</i> : : <i>kan</i>	P1Cm-Ts(QC1732) x PmntH	Cette étude
PmntH <i>fur::cat</i>	EMG2 <i>PmntH-luc</i> Δ <i>fur</i> : : <i>cat</i>	P1(QC2517) x PmntH <i>fur::kan</i>	Cette étude
PmntH <i>oxyR</i>	EMG2 <i>PmntH-luc</i> Δ <i>oxyR::kan</i>	P1 (QC2413) x PmntH	
PmntH <i>fur</i> <i>sodB</i>	EMG2 <i>PmntH-luc</i> Δ <i>fur</i> : : <i>cat</i> Δ <i>sodB</i> : : <i>kan</i>	P1(QC1799) x PmntH <i>fur::cat</i>	Cette étude
Plasmides			
pKO3	conçu pour effectuer des échanges d'allèles dans <i>E. coli</i> - origine de répllication thermosensible (dérivée de pSC101); gène <i>sacB</i> permettant l'expulsion du plasmide en présence de sucrose		Link <i>et al.</i> , 1997
pGBM6	conçu pour permettre l'expression de deux plasmides dans une même cellule; origine de répllication pSC101		Manen <i>et al.</i> , 1997
pKO5L3	dérivé de pKO3 avec un fragment 5' <i>mntH</i> -luciférase-3' <i>mntH</i>		Cette étude
pK5Mn	dérivé de pBluescript KS ⁺ avec le promoteur de <i>mntH</i> en phase avec le gène <i>mntH</i>		Cette étude
pGBmntHEc	dérivé de pGBM6 avec l'insert <i>PmntH+mntH</i> de pK5Mn		Cette étude
pGBmntHEcΔ	dérivé de pGBM6 avec un insert <i>PmntH+mntHΔ</i>		Cette étude

Les souches bactériennes ont été conservées soit à -20°C en présence de 50% de glycérol ou à -70°C avec 16% de glycérol. Les souches fréquemment utilisées ont été cultivées sur géloses et conservées pendant quelques semaines à 4°C avant d'être re-cultivées sur un milieu frais.

3.2 Produits chimiques et réactifs de biologie moléculaire

Les antibiotiques, les chélateurs de métaux, le NTA, les composés métalliques, le H_2O_2 et le paraquat proviennent de Sigma (Sigma-Aldrich Co., St-Louis, MO). Les autres composés chimiques proviennent de Sigma ou de ICN Biomedicals Inc. (Irvine, CA). La majorité des enzymes de restriction utilisés pour la biologie moléculaire proviennent de New England Biolabs Ltd. (NEB, Mississauga, ON). Certains enzymes utilisés avant 2000 provenaient de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). Les phosphatases alcalines (CIP) utilisées pour les réactions de déphosphorylation proviennent de Amersham ou de NEB. Des ligases T4 provenant de Amersham, NEB et Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON) ont été utilisées lors de ce projet. L'ADN polymérase *Pfu* provient de Stratagene (La Jolla, CA) et l'ADN polymérase *Taq* de Gibco BRL. Les radioisotopes proviennent de NEN Life Science Products (Boston, MA).

3.3 Manipulations d'ADN

3.3.1 Extraction de plasmides

Les extractions de plasmides pour des fins de clonage ont été effectuées à l'aide de trousse provenant de la compagnie QIAGEN Inc. (Mississauga, ON). Les trousse QIAprep Spin Miniprep et QIAGEN Plasmid Maxi ont été utilisées pour obtenir des quantités d'ADN plasmidique de l'ordre de 20 μg et de 500 μg , respectivement. Les manipulations ont été effectuées d'après les protocoles fournis par le manufacturier. Ceux-ci sont basés sur une méthode de lyse alcaline modifiée (Birnboim et Doly, 1979) et comprennent les grandes étapes suivantes : Un volume de 1 à 5 ml (miniprep) ou de 100 à 500 ml (maxiprep) d'une culture bactérienne de 16 heures a été concentré, resuspendu,

lysé et neutralisé à l'aide des solutions fournies par le fabricant : P1 (resuspension), P2 (lyse alcaline) et N3 (neutralisation lors de la miniprep) ou P3 (neutralisation lors de la maxiprep). Le lysat, récupéré suite à une étape de centrifugation à vitesse maximale, a ensuite été déposé sur la colonne fournie. Dans le cas de la miniprep, la colonne permet l'adsorption de l'ADN plasmidique en présence de hautes concentrations de sels. La colonne a ensuite été lavée et l'élution a été effectuée avec 50 µl d'une solution à faible concentration en sels (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5 ou H₂O). L'ADN obtenu était suffisamment concentré pour être utilisé directement. Dans le cas de la maxiprep, l'adsorption de l'ADN à la colonne s'effectue en présence de faibles concentrations en sels et l'élution nécessite un tampon à haute concentration en sels. L'ADN a ensuite dû être concentré lors d'une étape de précipitation à l'isopropanol, et lavé à l'aide d'une solution d'éthanol à 70%. Le culot d'ADN a finalement été resuspendu dans un volume approprié (250 à 500 µl) de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8). L'extraction de plasmides à faible nombre de copies a été réalisée à l'aide de la trousse miniprep, avec les modifications suivantes : un volume de 10 ml de culture a été réparti en quatre aliquots de 2,5 ml qui ont tous été lysés et précipités séparément. Les quatre surnageants ont ensuite été déposés successivement sur la même colonne. Les extractions de plasmides pour fins de vérification ont été effectuées d'après la méthode de la lyse alcaline décrite dans Sambrook *et al.* (1989) avec les modifications suivantes : les étapes d'extraction du surnageant au phénol-chloroforme ont été éliminées pour passer directement à l'étape de précipitation à l'isopropanol.

Les étapes de centrifugation ont été effectuées dans des micro-centrifugeuses « IEC *Micromax* » (IEC International Equipment Company, Needham Heights, MA) ou « Biofuge *Pico* » (Kendro Laboratory Products, Allemagne) dans le cas des petits volumes et dans des centrifugeuses Beckman J-21B ou J2-21M (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA) pour les grands volumes. La vitesse de centrifugation utilisée était toujours la vitesse maximale permise par le rotor.

Tableau 2. Oligonucléotides utilisés lors des réactions de PCR. Les mutations introduites sont indiquées en gras. Les sites de restriction sont soulignés.

Oligonucléotide	Séquence (sites de restriction)
IB1	5' ATG <u>CGG CCG</u> CAG ACG AAG TTA GTC C 3' (<i>NotI</i>)
IB2 (c)	5' CGC CAT GGT GTG CCT CTA AAA 3' (<i>NcoI</i>)
IB3	5' GGT <u>ACC</u> ATG GAA GAC GCC AAA AA 3' (<i>NcoI</i>)
IB4 (c)	5' GTT <u>GGA TCC</u> TAC AAT TTG GAC TTT 3' (<i>BamHI</i>)
IB5	5' GTA <u>GAT CTA</u> TGA GCG TCG CAT CTG GC 3' (<i>BglII</i>)
IB6 (c)	5' CAG GTA <u>CCT</u> GTT TCT <u>GGC GGC CGC</u> CC 3' (<i>KpnI, NotI</i>)
IB7 (c)	5' TCC CAT TAA TGC GAG CCT CAT CTT 3'
CKO3	5' AGG GCA GGG TCG TTA AAT AGC 3'
EKO33 (c)	5' TTA ATG CGC CGC TAC AGG GCG 3'
NRF1	5' AGA <u>GAT CTG</u> TCA TAC ATT TCT GCT 3' (<i>BglII</i>)
NRF2	5' GGT CTA GAA GAG AAA TCA CCA CAA TC 3'
NRR1 (c)	5' CCG CTG CAG GGA TAA GCG TAA AG 3'
R5B (c)	5' CGG <u>GAT CCC</u> CAT TCC TTT ACC CAG 3' (<i>BamHI</i>)
F3B	5' TCG <u>GAT CCG</u> GTC TTC CTG GCA GC 3' (<i>BamHI</i>)
412RS (c)	5' AGC CTC ATC AAG ATC GG 3'

(c) oligo correspondant au brin complémentaire

3.3.2 Réactions de polymérase en chaîne

Les réactions pour l'amplification de fragments d'ADN utilisés lors des clonages contenaient les réactifs suivants : 1 µl d'ADN plasmidique (à une concentration d'environ 1-5 ng/µl) ou d'ADN génomique (concentration ~ 50 ng/µl), du MgSO₄ (concentration finale allant de 2 à 12 mM), 2,5 µl de tampon *Pfu* (Stratagene), 1 mM de chaque dNTP, 1 µl d'une solution de 5 pmol/µl de chaque oligonucléotide et 0,2 µl de polymérase *Pfu*. La vérification des clonages par PCR a été effectuée de la façon suivante : des colonies obtenues lors de la transformation ont été dispersées une par une dans des puits contenant 100 µl d'eau stérile et 16,5 µl de cette solution ont été transférés à un mélange contenant 2,5 µl de tampon *Taq* 10X sans MgCl₂ (Gibco BRL), 100 µM de chaque dNTP, 1 mM de MgCl₂, 1 µl de solutions concentrées de chaque oligonucléotide (entre 80 et 150 pmol/µl) et 0,1 µl de polymérase *Taq*, dans un volume final de 25 µl. Afin de vérifier les échanges d'allèles par PCR, des colonies provenant des souches à tester ont été grattées à partir d'une strie sur gélose et dispersées dans 3 ml d'eau stérile de manière à obtenir une turbidité d'environ 0,5 par rapport à un standard McFarland (Remel, Lenexa KS). Un volume de 5 à 7 µl de cette suspension a été utilisé dans des réactions de PCR avec les réactifs suivants dans un volume final de 25 µl : 2,5 µl de tampon *Taq*, 1 mM de MgCl₂, 100 µM de chaque dNTP, 0,5 µl de chaque oligonucléotide (solutions concentrées) et 0,1 µl de polymérase *Taq*. Les différents échantillons ont été soumis à un minimum de 30 cycles d'amplification dans le « PTC-100™ Programmable Thermal Controller » (MJ Research Inc., Watertown, MA). Le programme général utilisé pour les amplifications est le suivant : 5 minutes à 94°C (dénaturation initiale), suivi de 30 cycles incluant 45 secondes de dénaturation à 94°C, 45 secondes d'hybridation à la température calculée pour chaque paire d'oligonucléotides, et un temps d'élongation à 72°C correspondant à la longueur du fragment attendu (1 minute par kilobase pour les amplifications avec la polymérase *Taq* et 1 minute par 0,5 kilobase pour les amplifications avec la polymérase *Pfu*). L'élongation à 72°C s'est poursuivie pour une période de 10 minutes à la fin des 30 cycles. La température d'hybridation a été calculée en utilisant la formule suivante pour chacun des oligonucléotides : 4°C x (nombre de G + nombre de C) + 2°C x (nombre de A + nombre de T). La température d'hybridation choisie pour le couple d'oligonucléotides

correspond à une température de 5°C en dessous de la température la plus basse obtenue (ex. si les températures calculées pour les deux oligos sont de 55°C et 59°C, la température d'hybridation sera de 50°C). Dans le cas d'oligonucléotides comportant des mutations à incorporer, la température d'hybridation est calculée avec et sans mutations. Les cinq premiers cycles d'amplifications sont effectués à la température qui ne tient pas compte des bases mutées et les 25 derniers cycles sont effectués à une température plus élevée qui tient compte des mutations. Une liste de tous les oligonucléotides utilisés lors de cette étude est donnée au tableau 2.

3.3.3 Réactions à l'aide d'enzymes de modification et purification des fragments

Les réactions de digestion, de déphosphorylation de vecteurs et de ligation ont été effectuées d'après les recommandations et à l'aide des tampons fournis par les manufacturiers. Le volume d'enzyme ajouté dans une réaction ne dépassait jamais 10% du volume total, afin d'éviter l'inhibition de la réaction par le glycérol. Le rapport entre la quantité de molécules d'insert et de vecteur lors des ligations était toujours de 2 :1, pour une quantité totale d'ADN variant entre 100 et 200 ng. L'ADN a été dosé d'après l'intensité relative des bandes sur gel d'agarose, ou encore à l'aide du « Low DNA Mass™ Ladder » (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON). Après les réactions de ligation, l'ADN a été précipité en ajoutant du NaCl à une concentration finale de 100 mM, du glycogène à une concentration finale de 1% et 3 volumes d'éthanol. La précipitation des fragments s'est poursuivie à -20°C pendant un minimum de 2 heures, après quoi les échantillons ont été centrifugés, lavés 2 fois dans l'éthanol à 70% et dissous dans un volume d'eau adéquat pour l'électroporation.

La purification des fragments d'ADN entre les différentes réactions enzymatiques a été effectuée à l'aide des colonnes S200 ou S300 (Amersham Pharmacia Biotech) ou avec la trousse « QIAquick PCR Purification Kit » (QIAGEN), suivant les instructions des manufacturiers. Dans le cas des colonnes S200 et S300, la solution d'ADN a simplement été appliquée sur la colonne et l'échantillon purifié a été récupéré après une

seule étape de centrifugation à 2700 rpm. Le protocole de purification à l'aide de la trousse « QIAquick PCR Purification Kit » se résume de la façon suivante : Les échantillons ont été dilués dans 5 volumes du tampon fourni (PB) et déposés sur la colonne. Cette colonne permet l'adsorption de l'ADN en présence de hautes concentrations en sels. La colonne a ensuite été lavée et l'élution a été effectuée avec un volume de 30 à 50 µl d'une solution à faible concentration en sels (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5 ou H₂O). L'ADN obtenu était suffisamment concentré pour être utilisé directement dans d'autres réactions. Les extractions de bandes à partir de gels d'agarose ont été effectuées à l'aide des trousse « BIO 101 GeneClean[®]II » (Qbiogene Inc., Carlsbad, CA) ou « QIAquick Gel Extraction Kit » (QIAGEN). Le protocole d'extraction à l'aide de la trousse « BIO 101 GeneClean[®]II » se résume comme suit : Les fragments d'ADN séparés par électrophorèse ont été révélés par rayonnement UV. Les bandes correspondant aux fragments à purifier ont été excisées à l'aide d'un scalpel et mélangées avec ½ volume de solution « TBE modifier » et 4,5 volumes d'une solution d'iodure de sodium 6 M. Un volume de 10 µl d'une suspension aqueuse de billes de silice (Glassmilk[®]) a ensuite été mélangé à la solution d'ADN et le tout a été incubé à la température de la pièce pour permettre l'adsorption de l'ADN à la matrice. Les billes ont été récoltées par centrifugation et lavées trois fois à l'aide de 200 à 700 µl de la solution de lavage fournie. Les billes ont ensuite été séchées à l'air libre et resuspendues dans un volume égal d'eau, ce qui a permis de resuspendre l'ADN collé aux billes. La solution d'ADN a ensuite été séparée des billes par centrifugation. Le protocole d'extraction à l'aide de la trousse « QIAquick Gel Extraction Kit » est identique à celui décrit pour la trousse « QIAquick PCR Purification Kit », à l'exception du tampon de dilution initial : Les bandes excisées ont été mélangées avec 3 volumes du tampon fourni (QG) et incubées à 50°C jusqu'à dissolution de l'agarose. La solution contenant l'ADN a ensuite été déposée sur la colonne. Toutes les étapes de centrifugation ont été réalisées dans des microcentrifugeuses, à la vitesse maximale (13000 rpm).

3.3.4 Électrophorèse des fragments d'ADN

L'électrophorèse de tous les fragments d'ADN a été effectuée dans des gels d'agarose dont la concentration variait entre 0,8 et 1,2%, dépendant de la taille des fragments. Les gels ont été préparés avec du tampon Tris-borate-EDTA 1X (TBE) et la migration s'est effectuée dans le même tampon, à un voltage constant de 90 à 115 V dans une cuve à électrophorèse « Owl EasyCast™ Minigel System » (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH). Les fragments d'ADN ont été visualisés après 30 minutes de coloration dans une solution de bromure d'éthidium (BrEt) à 500 µg/L. L'ADN a été révélé par rayonnement UV et photographié à l'aide du « BIO-RAD Gel Doc 1000 » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3.4 Préparation de cellules compétentes et transformation

Les ligations et les plasmides à faible nombre de copies ont été introduits dans *E. coli* par électroporation. La souche de *E. coli* DH11S (voir tableau 1) a été utilisée pour tous les clonages dans les plasmides dérivés de pBluescript II KS+ (Stratagene) et la souche DH1 a été utilisée pour les clonages dans des plasmides à faible nombre de copies dont l'origine de répllication est de type pSC101. Les cellules de *E. coli* compétentes pour l'électroporation ont été préparées selon le protocole suivant : Une culture de 16 heures en milieu riche a été diluée au 1/100 dans 500 ml de milieu LB. Les cellules ont été incubées jusqu'à l'obtention d'une OD₆₀₀ de 0,6 (étape 1). Après avoir refroidi sur la glace pendant 30 minutes (étape 2), les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4°C (20 minutes à 4000 rpm dans le rotor JA-10 d'une des centrifugeuses Beckman utilisées pour les extractions de plasmides) (étape 3). Les culots ont ensuite été délicatement dispersés et combinés dans un volume de 25 ml d'eau déionisée, stérile et glacée, après quoi 100 ml supplémentaires d'eau ont été ajoutés (étape 4). Les étapes 3 et 4 ont été répétées en faisant attention au culot qui se fragilise de plus en plus (les cellules ont été gardées sur la glace en tout temps). L'étape 3 a été répétée et les cellules ont été dispersées dans 5 ml d'une solution glacée de glycérol à 10% et transférées dans un tube de 13 ml avant d'être centrifugées une dernière fois à 4°C (5000 rpm pendant 15 minutes

dans un rotor JA-20 ou JA-21). Le culot a ensuite été dispersé une dernière fois dans 500 μ l de glycérol à 10% et des aliquots de 50 μ l ont été transférés dans des micro-tubes placés sur la glace sèche. Pour la préparation de petites quantités de cellules compétentes, tous les volumes ont été divisés par 10. Les cellules compétentes préparées de cette façon ont pu être conservées pendant plusieurs mois à -70°C .

Au moment de l'électroporation, les cellules compétentes préalablement décongelées dans un bain de glace ont été mélangées avec 1 à 2 μ l de solution d'ADN et transférées dans une cuvette d'électroporation de 0,1 cm glacée (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Les cellules ont été électroporées à 1,6 kV, avec 25 μ F de capacitance et 400 Ω de résistance, à l'aide d'une unité « BIO-RAD Gene-Pulser™ » (Bio-Rad Laboratories). Les échantillons ont été mélangés avec 1 ml de milieu SOC (20 g/L tryptone, 5 g/L extrait de levure, 0,5 g/L NaCl, 0,186 g/L KCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM glucose; Miller, 1992) et transférés à un tube de culture de polypropylène de 15 ml. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure, soit à 37°C ou à 30°C (pour les plasmides thermosensibles) avant d'être étalées sur milieu sélectif.

La transformation de bactéries avec des plasmides à copies multiples super-enroulés a été effectuée selon un protocole de transformation rapide décrit par Chung *et al.* (1989). Brièvement, des cultures de bactéries ont été diluées au 1/100 dans du LB et incubées jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} d'environ 0,3 à 0,4. Les cellules ont été concentrées et dispersées dans 1/10 du volume de milieu TSS 1X (LB + 10% PEG 8000, 40 mM Mg^{2+} et 5% DMSO). Les cellules ont ensuite été incubées sur glace pendant 15 minutes avant d'être séparées en aliquots de 100 μ l, mélangées avec 1 μ l de plasmide (~ 100 pg à 1 ng d'ADN) et incubées à nouveau sur glace pendant une période de 30 minutes. Les cellules ont par la suite été mélangées à 0,9 ml de milieu SOC et incubées à 37°C pendant 1 heure avec agitation avant d'être étalées sur milieu sélectif.

3.5 Construction d'une fusion intra-chromosomique *PmntH*-luciférase

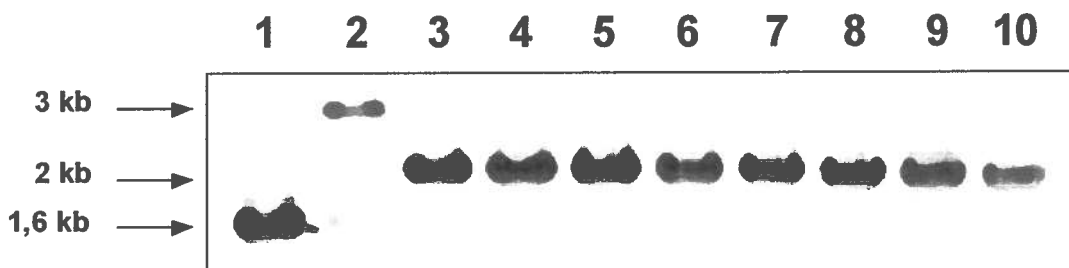
Le plasmide pKO3 (Link *et al.*, 1997) a été utilisé pour créer une fusion transcriptionnelle intra-chromosomique entre le promoteur du gène *mntH* de *E. coli* et le gène de la luciférase (fusion *PmntH-luc*). L'allèle *mntH::kan* de la souche 422 (voir tableau 1) a été remplacé par le gène de la luciférase par la stratégie suivante. La région en amont du gène *mntH* a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de la souche EMG2 de *E. coli* K-12, à l'aide de la polymérase *Pfu* et des oligonucléotides IB1 et IB2. La réaction d'amplification en présence de 4 mM de MgSO₄ a donné le produit attendu de 583 paires de bases (pb) (fragment 5'*mntH*). Le gène de la luciférase a été amplifié à partir du plasmide pXP2 (Nordeen, 1988) en utilisant le polymérase *Pfu* et les oligonucléotides IB3 et IB4. Le produit attendu de 1652 pb a été obtenu en présence de 2 mM de MgSO₄. Le fragment 5'*mntH* a été digéré avec les enzymes *NotI* et *NcoI* et le fragment du gène de la luciférase a été coupé avec les enzymes *NcoI* et *BamHI*. Les deux fragments ont été insérés en une étape dans le vecteur pBluescript II KS+ (Stratagene) linéarisé avec les enzymes *NotI* et *BamHI* et déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline. Le plasmide résultant a été nommé pK5luc. Une partie de la région en 3' du gène *mntH* a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche EMG2, à l'aide de la polymérase *Pfu* et des oligonucléotides IB5 et IB6. Le produit de 460 pb attendu (fragment 3'*mntH*) a été obtenu en présence de 8 mM de MgSO₄. Ce fragment a ensuite été digéré avec les enzymes *KpnI* et *BglIII* et inséré à la suite du gène de la luciférase dans le plasmide pK5luc digéré avec les enzymes *KpnI* et *BamHI*. Le plasmide résultant a été nommé pK5luc3. Un fragment *NotI-NotI* de 2,7 kb comprenant la région en 5' de *mntH*, suivi du gène de la luciférase et de la région en 3' de *mntH* a été extrait du plasmide pK5luc3 et transféré dans le plasmide pKO3 linéarisé par *NotI*. Le plasmide résultant, pKO5L3, a été utilisé pour effectuer un échange d'allèles dans la souche 422, d'après la méthode décrite par Link *et al.* (1997). Brièvement, le plasmide pKO5L3 a été introduit dans la souche 422 par électroporation. Dix colonies résistantes au chloramphénicol et à la kanamycine à 30°C (température permissive) ont été dispersées dans 1 ml de milieu LB et diluées dans le même milieu. Un volume de 100 µl des dilutions 1 x 10⁻¹, 1 x 10⁻² et 1 x 10⁻³ a été étalé sur du milieu LB + chloramphénicol et kanamycine et les géloses ont été

incubées à 43°C (température restrictive). Les dilutions 1×10^{-3} et 1×10^{-4} ont été étalées et incubées à 30°C pour permettre le calcul de la fréquence d'intégration (nombre de colonies à 43°C/nombre de colonies à 30°C). Dix grosses colonies provenant des géloses à 43°C ont été dispersées et diluées dans 1 ml de milieu LB sur glace. Les dilutions 1×10^{-2} , 1×10^{-3} et 1×10^{-4} ont été étalées sur milieu LB contenant 5% de sucrose et incubées à 30°C. Les dilutions 1×10^{-4} et 1×10^{-5} ont été étalées sur LB + chloramphénicol et kanamycine et incubées à 43°C pour permettre le calcul de la fréquence d'excision et expulsion (nombre de colonies à 30°C/nombre de colonies à 43°C). Les colonies isolées sur LB + sucrose à 30°C ont été sélectionnées pour la perte de résistance à la kanamycine et au chloramphénicol (indiquant la perte de l'allèle *mntH::kan* et l'expulsion du plasmide). La présence du gène de la luciférase dans le chromosome a été vérifiée par PCR à l'aide de la polymérase *Taq* et des oligonucléotides NRF2 et NRR1, qui ciblent des séquences en amont et en aval du gène *mntH*, respectivement. La présence d'un fragment d'environ 2,1 kb indique que le gène *mntH* a été remplacé par le gène de la luciférase, qui est plus long d'environ 0,4 kb. Tous les clones testés se sont avérés positifs pour l'échange d'allèles (voir figure 5). Une des souches a été choisie pour les expériences subséquentes et nommée PmntH.

3.6 Construction de plasmides permettant de compléter la croissance

Le plasmide pK5Mn a été obtenu par ligation en une seule étape du fragment 5'*mntH* digéré avec *NotI* et *NcoI* et d'un fragment *NcoI-BamHI* provenant du plasmide pBAD-*mntH* (Makui et al., 2000) et représentant la totalité du gène *mntH* de *E. coli*, dans le vecteur pBluescript II KS+ linéarisé avec les enzymes *NotI* et *BamHI*. Le plasmide pGBmntHEc a été construit en introduisant un fragment *SacI-KpnI* provenant de pK5Mn et comprenant le promoteur et le gène *mntH*, dans le vecteur pGBM6 (Manen et al., 1997) digéré avec les mêmes enzymes. Le plasmide pGBmntHEc Δ a été construit en deux temps. Premièrement, le plasmide pK5Mn a été digéré avec les enzymes *NcoI* et *XcmI*, afin de créer une délétion interne de 712 pb dans le gène *mntH*. Le fragment correspondant au vecteur a été isolé à partir d'un gel et incubé en présence de l'ADN polymérase T4 (NEB) pour créer des bouts francs. Le vecteur a ensuite été recircularisé

Figure 5. Vérification de la création d'une fusion intra-chromosomique *PmntH*-luciférase. Une réaction de PCR avec le couple d'amorces NRF2-NRR1 a été effectuée sur des lysats de bactéries. Les amorces NRF2 et NRR1 ciblent des séquences en amont et en aval du gène *mntH*, respectivement. Puits 1 : souche EMG2, puits 2 : souche 422, puits 3 à 10 : clones sélectionnés lors de l'échange d'allèles.



par ligation pour donner le plasmide nommé pK5Mn Δ . Un fragment *SacI-KpnI* provenant de pK5Mn Δ a ensuite été cloné dans le vecteur pGBM6 digéré avec les mêmes enzymes pour donner le plasmide pGBmntHEc Δ .

3.7 Transductions de mutations à l'aide du phage P1

La préparation de lysats de phages P1 a été effectuée d'après une méthode basée sur celle de Miller (1992). Des souches ne contenant aucun gène de résistance aux antibiotiques (ex. EMG2) ont été utilisées pour la propagation du phage P1. Une culture de la souche a été préparée en diluant une culture saturée au 1/100 dans 3 à 6 ml de LB contenant 5×10^{-3} M de CaCl₂. La culture a été incubée dans un bain à 37°C jusqu'à l'atteinte d'une DO₆₀₀ d'environ 0,2 à 0,5 et répartie en aliquots de 1 ml dans des tubes de culture, avant d'être incubée pendant une heure à 37°C, avec agitation. La souche donneuse a ensuite été infectée avec différents volumes d'un lysat du phage P1_{vir} ou P1Cm-Ts. L'adsorption du phage s'est effectuée dans un bain à 37°C pendant 20 minutes, après quoi la culture a été mélangée avec 2,5 ml de milieu « R agar » mou et versée sur géloses « R agar ». Les géloses ont été incubées à l'endroit à 37°C pendant 16 heures. Les géloses où toutes les bactéries ont été lysées ont pu être utilisées directement pour la préparation du lysat. Dans le cas où aucune des géloses ne présentait une lyse totale du tapis bactérien, l'étape de propagation a dû être recommencée en infectant la souche EMG2 avec une plage de lyse isolée. Les lysats ont été préparés en récupérant la couche d'agar mou contenant les phages à l'aide d'un volume d'environ 1 ml de milieu LB par gélose infectée. Le mélange d'agar mou a ensuite été transféré à des microtubes, 5 gouttes de chloroforme ont été ajoutées et le tout a été mélangé vigoureusement au vortex pendant 30 secondes. Les tubes ont été centrifugés à 9000 rpm pendant 2 minutes et le surnageant a été récupéré. Une seconde centrifugation a permis d'enlever le reste des débris, après quoi le surnageant contenant le phage a été récupéré, 3 gouttes de chloroforme ont été ajoutées et le lysat a été entreposé à 4°C. Le titre du lysat a été déterminé en infectant à nouveau *E. coli* EMG2 (ou une autre souche sans résistance aux antibiotiques) avec différentes dilutions du nouveau lysat (dans du milieu LB CaCl₂ 5×10^{-3} M) et en comptant les plages de lyse après incubation sur milieu « R agar ».

Les transductions par les phages P1_{vir} ou P1Cm-Ts de mutations associées à des gènes de résistance aux antibiotiques ont été effectuées selon une méthode basée sur celle décrite par Miller (1992). L'infection des souches donneuses par le phage P1 s'est fait tel que décrit pour la propagation du phage dans EMG2, sauf que les souches ont été infectées avec 1×10^7 pfu d'un lysat du phage P1_{vir} ou P1Cm-Ts. Le lysat a été préparé tel que décrit dans le paragraphe précédant. Pour la transduction des mutations dans la souche receveuse, une culture saturée de celle-ci a été concentrée et resuspendue dans un volume égal de tampon MC (100 mM MgSO₄; 5 mM CaCl₂). Un volume de 100 µl de culture a ensuite été mélangé avec 100 µl de différentes dilutions de lysat et les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 20 minutes. Par la suite, 200 µl de tampon citrate à 0,1 M (pH 5,5) a été ajouté à chaque tube et un volume de 100 µl de chaque mélange a été étalé sur un milieu sélectif. Des contrôles sans lysat ou sans cellules bactériennes ont été inclus lors de chaque transduction.

3.8 Mesures du transport de manganèse

Les expériences de transport de manganèse ont été réalisées par le technicien Jacques Beaubien tel que décrit dans l'article de Makui *et al.* (2000). En résumé, les souches de *E. coli* ont été incubées jusqu'au début de phase exponentielle ($DO_{600} = 0,6$) en milieu LB. Les bactéries ont été récupérées par centrifugation et traitées à l'EDTA pour perméabiliser la membrane externe. Les cellules ont été resuspendues dans le milieu de transport (40 mM MOPS, pH 7,4, 5 mM Na-β-glycérophosphate, 5 mM MgSO₄, 0,2% glucose, 0,1 mM NTA, 1 mM Na-Ascorbate), à une DO_{600} finale de 5. Les bactéries ont ensuite été pré-incubées pendant 5 minutes à 37°C ou à 4°C, avec agitation. L'isotope $^{54}\text{Mn}^{2+}$ a été ajouté à une concentration finale de 3 µM (activité spécifique finale de 41 µCi mmol⁻¹). Dans certaines expériences, le protonophore de membrane CCCP (hydrazone méta-chlorophénylique de cyanure carbonyle) a été ajouté à une concentration de 33 µM, 1 minute avant l'ajout de l'isotope radioactif. Le transport a été arrêté après 6 minutes par dilution dans 5 ml de solution « STOP » glacée (Tris 5 mM, pH 8, EDTA 0,2 mM, NTA 0,1 mM) et les échantillons ont été immédiatement filtrés sur des

membranes de nitrocellulose de 0,45 μm . Les filtres ont été lavés une fois avec 3 ml de solution « STOP » et séchés à température de la pièce. La quantité de radioactivité dans chaque échantillon a ensuite été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations.

3.9 Mesures d'expression de la fusion *PmntH*-luciférase

Les solutions concentrées de chélateurs de métaux utilisées lors de ces expériences étaient les suivantes : DP 50 mM (dilué dans l'éthanol à 10%); BPS 25 mM (dilué dans le Tris-HCl 1 M, pH 7.5); Fz 25 mM (dilué dans le Tris-HCl 1 M, pH 7.5); TPEN 20 mM (dilué dans le DMSO); DPTA 50 mM (dilué dans NaOH 200 mM). Pour les expériences d'expression en milieu riche, des cultures saturées de souches de *E. coli* contenant la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* ont été diluées au 1/40 dans du milieu LB et incubées jusqu'au début de la phase exponentielle ($\text{DO}_{600} = 0,6$). Des solutions d'inducteurs à une concentration de 10X ont été préparées dans du milieu LB et 200 μl de ces solutions ont été ajoutés à 1,8 ml de culture en phase exponentielle. L'incubation des cellules en présence d'inducteurs s'est poursuivie pendant une période de 45 minutes (à moins d'indication contraire), après quoi des lysats ont été préparés et l'activité de la luciférase a été déterminée. La préparation des lysats a été effectuée d'après le protocole suggéré par les fabricants de la trousse « Luciferase Assay System » de Promega (Promega Corporation, Madison, WI) pour la préparation de lysats bactériens. Les modifications au protocole sont indiquées en gras. Un volume de 90 μl de culture bactérienne induite a été mélangé avec 10 μl de la solution K_2HPO_4 1M (pH 7.8), EDTA 20mM. Les échantillons ont ensuite été congelés rapidement sur la neige carbonique et équilibrés dans un bain d'eau à température de la pièce. Un volume de 300 μl de tampon de lyse a été ajouté à chaque échantillon. Le tampon de lyse a été préparé en mélangeant 1 volume de lysozyme (5 mg/ml de lysozyme dans une solution de K_2HPO_4 100 mM, EDTA 2 mM) à 2 volumes de solution « Cell Culture Lysis Reagent » 2X (Tris-phosphate 50 mM, pH 7.8, DTT 4 mM, acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tétraacétique 4 mM, glycérol 20%, Triton[®] X-100 2%; fournie à une concentration 5X avec la trousse) contenant 5 mg/ml de BSA. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 10 minutes dans un bain à température de la pièce. Un volume de 10 μl de lysat a été mélangé avec

45 μ l de substrat (fourni avec la trousse) immédiatement avant la lecture de l'activité de la luciférase. Les lectures ont été effectuées à l'aide du luminomètre « EG & G Berthold Lumat LB 9507 » (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne). Pour les études d'expression en milieu minimal, des cultures saturées en LB ont été lavées deux fois avec du milieu G/M sans ions et utilisées pour inoculer le milieu G/M riche en fer à une DO_{600} initiale de 0,05 pour les souches PmntH, PmntH[pK5Mn] et PmntHfur[pK5Mn] et à un DO_{600} de 0,15 pour la souche PmntHfur. Les souches ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, lavées une fois avec une solution d'EDTA à 5 mM et deux autres fois avec du milieu G/M sans ions avant d'être utilisées pour inoculer du milieu frais contenant différentes concentrations d'ions métalliques à une DO_{600} initiale de 0,05 pour toutes les souches. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 16 heures, après quoi des lysats ont été préparés et l'activité de la fusion *PmntH-luc* a été mesurée tels que décrit pour les expériences en milieu riche. Pour les expériences visant à déterminer l'influence du manganèse sur l'expression de *mntH* lors d'une culture prolongée, une culture saturée de la souche PmntH a été lavée et utilisée pour inoculer du milieu G/M riche en fer avec ou sans micro-éléments, à une DO_{600} initiale de 0,05. La culture a été utilisée directement pour inoculer du milieu frais à toutes les 24 heures et des lysats ont été préparés à tous les deux jours pour vérifier l'activité de la fusion *PmntH-luc*.

3.10 Buvardage de type Northern

La souche EMG2 a été incubée jusqu'au début de la phase exponentielle et induite avec 150 μ M de 2,2'-dipyridyl (DP) de la manière décrite pour les expériences d'expression. L'ARN total a ensuite été extrait à l'aide de la trousse « QIAGEN RNeasy Mini Kit » (QIAGEN Inc., Mississauga, ON), suivant le protocole recommandé pour les bactéries. Brièvement, les bactéries contenues dans un volume de 1,5 ml de culture ont été récoltées par centrifugation à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 100 μ l de tampon TE contenant 400 μ g/ml de lysozyme et incubé pendant 5 minutes à la température de la pièce. Les échantillons ont ensuite été mélangés à 350 μ l d'un tampon dénaturant contenant de l'isothiocyanate de guanidine et 10 μ l de β -mercaptoéthanol par ml (tampon RLT) et centrifugés à 13000 rpm. Les surnageants ont été récupérés et mélangés avec 250

μ l d'éthanol concentré. Les échantillons ont ensuite été déposés sur les colonnes fournies dans la trousse et centrifugés à vitesse réduite (10000 rpm). Ces colonnes permettent l'adsorption sélective des ARN d'une longueur supérieure à 200 pb. Les colonnes ont été lavées avec les tampons fournis et l'ARN a été élué avec 30 μ l d'eau exempte d'ARNases. Une dilution au 1/20 de chaque échantillon a été préparée et la concentration finale a été évaluée à environ 300 μ g/ml à l'aide d'un spectrophotomètre « GeneQuant pro RNA/DNA calculator » (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Les solutions d'ARN ont été stockées à -70°C jusqu'à l'utilisation. Un volume de 5 μ l d'ARN mélangé à 20 μ l de tampon dénaturant (préparé en mélangeant 500 μ l formamide, 169 μ l formaldéhyde et 100 μ l tampon de migration 10X) et à 2 μ l de tampon de coloration (50% glycérol, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,25% bleu de bromophénol et 0,5 mg/ml EtBr) a été déposé sur un gel d'agarose 1% dénaturant (contenant 17% de formaldéhyde). La migration des échantillons dans le gel s'est effectuée à un voltage constant de 70 kV, dans le tampon de migration 1X suivant : 4 g/L MOPS, 0,34 g/L NaOAc-3 H₂O, 0,37 g/L EDTA et 0,49 g/L NaOH. Après la migration, le gel a été trempé pendant 45 minutes dans une solution de SSC 10X (solution à pH 7,0 de 1,5 M NaCl, 0,15 M citrate de sodium) et les échantillons d'ARN ont été transférés par capillarité à une membrane de nylon « GeneScreen Plus » (NEN Life Science Products, Boston, MA), à l'aide du « Life Technologies™ Blot Transfer System 11•14 » (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) (durée du transfert = 24 à 48 heures). Les membranes ont été séchées entre deux papiers buvards, traitées aux rayons UV dans le « BIO-RAD GS Gene Linker™ UV Chamber » (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) et cuites à 80°C dans un four pendant 2 heures.

La sonde radioactive utilisée pour la révélation de l'ARN *mntH* est la même que celle utilisée par Makui *et al.* (2000) et correspond à un fragment interne du gène *mntH* de *E. coli* (nucléotides 354 à 667). Le fragment provient d'un clone obtenu de l'ATCC. La séquence de l'insert avait été déposée dans la banque de gènes humains bien qu'elle représente en réalité une contamination provenant de *E. coli* (clone EST yu01c01.r1, GenBank gb|H96928, Image clone no. 232 5i2, ATCC numéro 479 257). L'insert provenant de ce clone a été marqué de la façon suivante : un volume de 34 μ l a été chauffé à 100°C pendant 10 minutes et mélangé avec 5 μ l de α -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) et 10 μ l

de « oligo-labelling buffer 5X » (OLB, préparé à partir de 3 solutions : 1) solution O : 1,25 M Tris-HCl, pH 8,0, 1,25 M MgCl₂; 2) solution A : 2 ml solution O, 36 µl 2-mercaptoéthanol, 10 µl de solution à 100 mM de chaque dNTP sauf le dCTP; 3) solution à 90 unités/ml d'hexamères aléatoires [Amersham Pharmacia Biotech]; OLB 5X : 200 µl solution A, 500 µl HEPES, pH 6,6 et 300 µl solution B). Après l'addition de 1 µl de polymérase « Klenow » (Amersham Pharmacia Biotech), la réaction a été incubée pendant 24 heures à température de la pièce. La sonde a ensuite été lavée de la façon suivante : trois colonnes ont été préparées en compactant de la laine de verre dans une seringue de 1 ml sans piston et en remplissant les seringues de Sephadex G-50 équilibré avec du tampon TNE 1X, pH 7.4 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl). Un micro-tube à bouchon vissable servant de tube collecteur a été placé sans son bouchon au bout de la seringue, et le tout a été placé dans un tube de polypropylène de 15 ml. Les colonnes ont été lavées deux fois avec un volume de 150 µl de tampon TNE en centrifugant pendant 3 minutes à 1700 rpm dans une centrifugeuse « IEC Centra CL2 » (International Equipment Company, Needham Heights, MA). Un volume de 150 µl de TNE a été ajouté à la sonde et le tout a été chauffé à 65°C pendant 5 minutes afin de liquéfier le mélange. Après avoir changé les tubes collecteurs à l'extrémité des colonnes, un volume de 67 µl du mélange contenant la sonde a été déposé sur chaque colonne et le tout a été centrifugé pendant 3 minutes à 1700 rpm. Les colonnes ont été lavées avec un volume supplémentaire de 50 µl de TNE et les éluats ont été regroupés (volume final d'environ 400 µl). Un volume de 2 µl de sonde a été déposé sur un papier-filtre dans un vial à scintillation et la quantité de radioactivité a été évaluée à 65 940 CPM/µl à l'aide du compteur à scintillation « Beckman LS 1701 Liquid Scintillation System » (Beckman Instruments- Nuclear Systems Operations, Fullerton, CA).

Le tampon d'hybridation a été préparé de la façon suivante : 15 ml d'eau MilliQ stérile pré-chauffée à 65°C et 6 ml de dextran 50% (10 g dans 20 ml H₂O; chauffé à 65°C pendant au moins 4 heures) ont été mélangés et incubés à 65°C pendant 10 minutes. Les additions successives de 6 ml de NaCl 5 M et de 3 ml de SDS 10% ont chacune été suivies d'une incubation de 10 minutes à 65°C. Finalement, 600 µl d'ADN de sperme de hareng à 10 mg/ml (préalablement bouilli pendant 15 minutes) ont été ajoutés au

mélange. Un volume de 15 ml de cette solution a été ajouté aux membranes enroulées dans du treillis de nylon placé dans les tubes à hybridation. Les membranes ont été pré-hybridées à 65°C pendant 4 heures dans un incubateur « Robbins Scientific Hybridization Incubator Model 310 » (Robbins Scientific Corporation, Sunnyvale, CA). Au moment de l'hybridation, la sonde a été bouillie pendant 10 minutes à 100°C. La sonde a été ajoutée à 10 ml de solution d'hybridation fraîche à une concentration finale de 2×10^6 CPM/ml et les membranes ont été incubées à 65°C en présence de la sonde pendant 16 à 48 heures. L'hybridation a été suivie de lavages avec les solutions suivantes, pré-chauffées à 65°C : un lavage avec 10 ml de SSC 1X (2 minutes), 2 lavages avec 125 ml de SSC 1X + SDS 0,1% + lauryl sarcosyl 0,02% (15 à 30 minutes chacun), un lavage avec 50 ml de SSC 0,1X + SDS 0,1% + lauryl sarcosyl 0,02% (5 minutes) et 2 lavages avec 100 ml de de SSC 0,1X + SDS 0,1% + lauryl sarcosyl 0,02% (15 minutes chacun). La membrane mouillée a ensuite été enveloppée dans une pellicule de plastique et placée dans une cassette « Spectroline » de 8 x 10 pouces (Spectronics Corporation, Westbury, NY) et exposée sur film « Kodak Scientific Imaging » (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) entre deux écrans. La cassette a été placée dans un congélateur à -70°C l'exposition s'est poursuivie pendant 72 heures, après quoi le film a été développé à l'aide du « Mini-Med/90 X-Ray Film processor (AFP Imaging Corp. Elmsford, NY).

3.11 Expériences de retard sur gel

Un fragment de 170 pb comprenant le promoteur de l'opéron *iuc* (*Piuc*) a été préparé en digérant le plasmide pDT10 (Dubrac et Touati, 2002) avec les enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Un fragment de 170 pb incluant le promoteur du gène *mntH* de *E. coli* (*PmntH*) et le site prédit de liaison au répresseur Fur a été amplifié à partir de l'ADN génomique de *E. coli* EMG2 à l'aide des oligonucléotides NRF2 et IB7. Un fragment de 245 pb comprenant une portion du gène *mntH* a été amplifié avec les oligonucléotides F3B et 412RS. Les extrémités des fragments *Piuc* et *PmntH* ont été marquées avec le [γ^{32} P]-ATP à l'aide de la polynucléotide kinase T4 (T_4 PNK, NEB). La réaction de marquage était composée des réactifs suivants, dans un volume final de 20 μ l : 40 ng de fragment à marquer, 2 μ l de tampon T_4 PNK, 2 μ l de [γ^{32} P]-ATP (10 μ Ci/ μ l) et 2 μ l de

T₄PNK (10 000 unités/ml). La réaction a été incubée à 37°C pendant deux heures. La sonde a été lavée à l'aide de la trousse « QIAGEN Nucleotide Removal Kit » (QIAGEN Inc., Mississauga, ON). Le protocole d'extraction est semblable à celui décrit pour la trousse « QIAquick PCR Purification Kit » avec les modifications suivantes : La sonde est diluée dans 10 volumes du tampon fourni (PN), la vitesse de centrifugation est de 6000 rpm (sauf l'étape d'élution, qui se fait à 13 000 rpm) et l'étape de lavage est réalisée deux fois. Finalement, l'ADN est élué avec 100 µl à 200 µl de tampon Tris-Cl 10 mM, pH 8,5. La quantité de radioactivité de la sonde a été déterminée tel que décrit dans la section précédente. L'activité de toutes les sondes était d'au moins 100 000 CPM/µl. La protéine Fur purifiée par Michaud-Soret *et al.* (1997), a été fournie par D. Touati et utilisée selon ses recommandations. Les dilutions ont été effectuées dans le tampon suivant : Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), KCl 0,1 M, glycérol 10%. Différentes concentrations de protéine Fur ont été mélangées avec les fragments d'ADN marqués dans le tampon de liaison décrit par de Lorenzo *et al.* (1988) (10 mM tampon Bis-Tris, pH 7,5, 5 µg/ml ADN de sperme de hareng, 5% glycérol, 100 µM MnCl₂, 100 µg/ml BSA, 1 mM MgCl₂, 40 mM KCl), en présence ou absence de fragments d'ADN compétiteurs non-marqués. Le volume final des réactions était de 20 µl et les réactions ont été incubées à 37°C pendant 15 minutes. Un volume de 10 µl de chaque réaction a été déposé sur gel de polyacrylamide (5%) contenant 1,35% de glycérol et polymérisé dans un tampon contenant 20 mM de tampon Bis-Tris (pH 7,5) et 100 µM MnCl₂. Une pré-migration du gel dans le même tampon a été effectuée à 105 V pendant au moins 30 minutes avant que les échantillons ne soient déposés sur le gel. Les échantillons ont migré à 105 V dans une cuve à électrophorèse « Mini-PROTEAN 3 » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) pendant environ 90 minutes, ou jusqu'à ce que le xylène cyanol (tampon de chargement 10X : 250 mM Tris-HCl pH 7,9; 40% glycérol; 0,2% bleu de bromophénol et xylène cyanol) présent dans le premier et le dernier puits pour indiquer le front de migration se rende au bas du gel. Les gels ont été enveloppés dans une pellicule de cellophane et exposés pendant 2 heures dans une cassette « Molecular Dynamics™ Phosphor Screen » de 20 x 25 cm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) et le signal a été révélé à l'aide du « Molecular Dynamics™ PhosphorImager™ SI ».

3.12 Expériences de croissance en milieu minimal

Des cultures saturées en milieu riche ont été lavées deux fois en milieu G/M sans ions et utilisées pour inoculer le milieu G/M riche en fer à une DO_{600} initiale de 0,05 (volume final de 2 ml dans un tube de culture en polypropylène de 15 ml). La densité optique de chaque culture a été mesurée après 24 heures d'incubation à 37°C.

3.13 Tests de diffusion sur milieu solide

Des cultures saturées ont été diluées au 1/40 dans du milieu LB frais et ont été incubées jusqu'à l'atteinte de la phase exponentielle ($DO_{600} = 0,6$). Un volume de 100 μ l de ces cultures a été mélangé à 3 ml d'agar LB mou (supplémenté avec 30 μ l d'une solution 100X de $MnCl_2$, lorsqu'indiqué), et le tout a été étalé sur géloses LB. Un filtre de cellulose Whatman No. 2 de 7 mm de diamètre, imprégné de 10 μ l de H_2O_2 (30,4%) ou de paraquat (100 mM), a été placé au centre de la gélose avant l'incubation de 16 heures à 37°C. Les résultats ont été considérés statistiquement significatifs lorsque la différence de diamètre de la zone d'inhibition par rapport au contrôle avait une valeur de $p < 0,05$, tel que déterminé par le test de t-Student (Milton, 1992).

4. RÉSULTATS

4.1 Construction d'une fusion transcriptionnelle *PmntH*-luciférase

Afin d'étudier la régulation du gène *mntH* de *E. coli*, nous avons construit une souche, nommée *PmntH*, dans laquelle le gène *mntH* a été remplacé par le gène rapporteur luciférase (voir matériel et méthodes). La fusion transcriptionnelle intrachromosomique ainsi obtenue (*PmntH-luc*) est représentée à la figure 6. La souche *PmntH* permet de mesurer l'activité du promoteur de *mntH* à l'aide de la quantité de lumière produite par la luciférase.

4.2 L'expression de *PmntH-luc* augmente en présence de chélateurs de métaux

Tel que mentionné précédemment, certaines expériences effectuées au laboratoire du Dr. Cellier ont suggéré que le gène *mntH* est exprimé en présence de 2,2'-dipyridyl (DP), un chélateur de métaux divalents ayant une affinité particulière pour le fer ferreux (Makui *et al.*, 2000). Nous avons donc choisi la présence de DP comme première condition pour étudier la régulation de *mntH*. Des cultures en phase exponentielle en milieu nutritif LB ont été incubées en présence de DP pour une période de 45 minutes. Les résultats présentés à la figure 7A démontrent une induction de l'activité du promoteur de *mntH* en présence de DP. Cette induction, qui atteint un niveau maximal équivalent à environ 40 fois le niveau de base, est dépendante de la dose entre 50 et 200 μM de DP. Afin de démontrer que l'induction du gène *mntH* en présence de DP se produit réellement au niveau du gène endogène, et qu'il ne représente pas un effet artificiel du système de fusion avec le gène de la luciférase, les ARN messagers ont été extraits de la souche originelle incubée en présence de DP. Le buvardage de type Northern effectué sur les ARN extraits démontre clairement que l'induction du gène se fait au niveau transcriptionnel et que la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* représente un outil de travail fiable (voir figure 7B).

Figure 6. Représentation schématique de la fusion intra-chromosomique *PmntH*-luciférase. Le gène *mntH* a été remplacé par le gène rapporteur de la luciférase par échange d'allèles à l'aide du plasmide pKO5L3. Le site *NcoI* a été introduit par mutagenèse dirigée. Les positions approximatives des gènes sur le chromosome de *E. coli* K-12 sont indiquées. Le produit du gène *nupC* est un transporteur de nucléosides et la fonction du gène *yfeO* (b2389) n'est pas encore connue (National Center for Biotechnology Information).

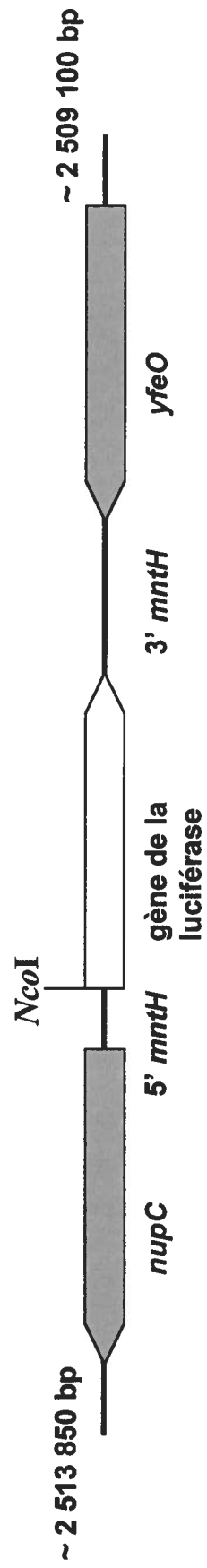
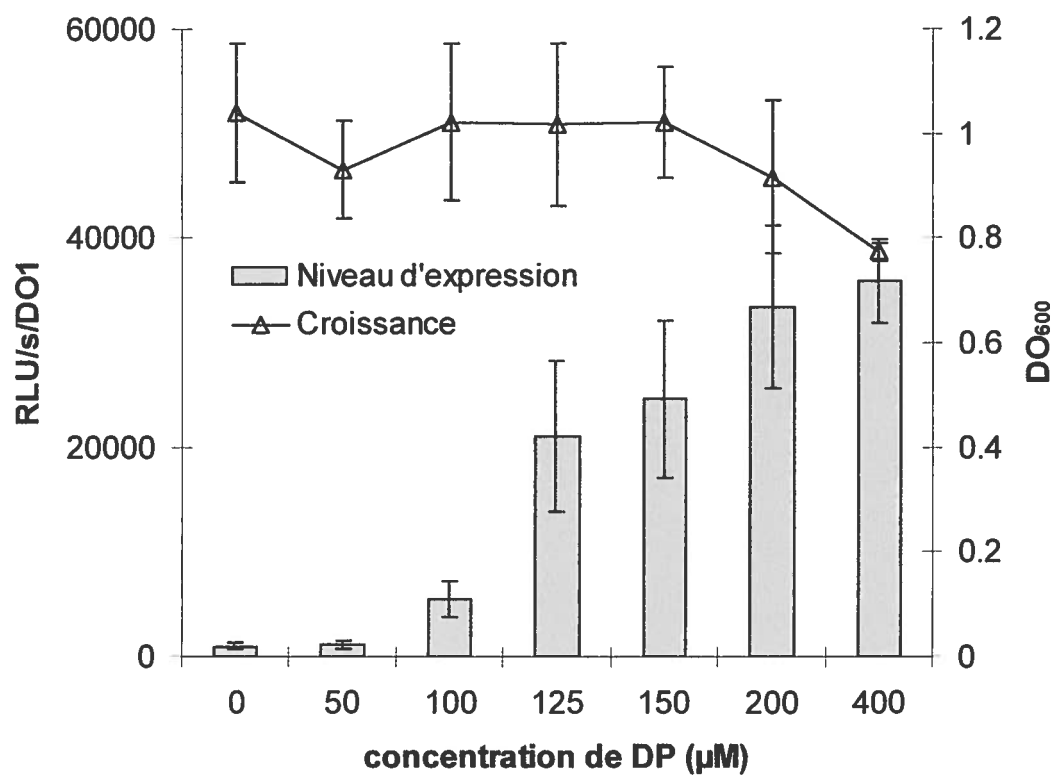
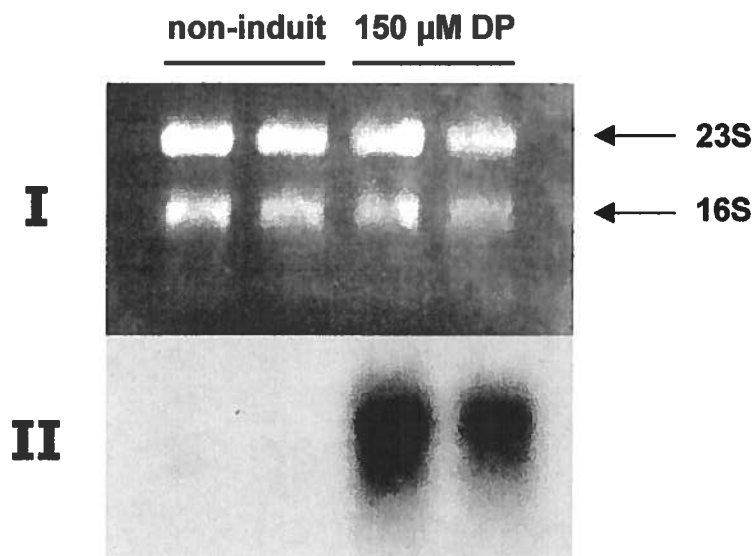


Figure 7. Régulation du gène *mntH* par le DP. A) Activité de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* en réponse au DP. Les bactéries en phase exponentielle ont été incubées pendant 45 minutes en présence d'une gamme de concentrations de DP. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne des résultats de trois expériences indépendantes pour les concentrations de 0, 100 et 200 μM de DP et sur la moyenne de deux expériences pour les concentrations de 50, 125, 150 et 400 μM de DP. B) Buvardage de type Northern sur les ARN extraits de la souche EMG2 exposée ou non à 150 μM de DP lors de la croissance en phase exponentielle. Les bactéries ont été incubées tel que décrit en A. (I) Révélation des ARN 23S et 16S à l'aide de la coloration au BrEt; (II) Révélation des ARNm *mntH* à l'aide d'une sonde correspondant à un fragment interne du gène *mntH* (voir matériel et méthodes). Puits 1 et 2, échantillons non-induits; puits 3 et 4, échantillons exposés au DP.

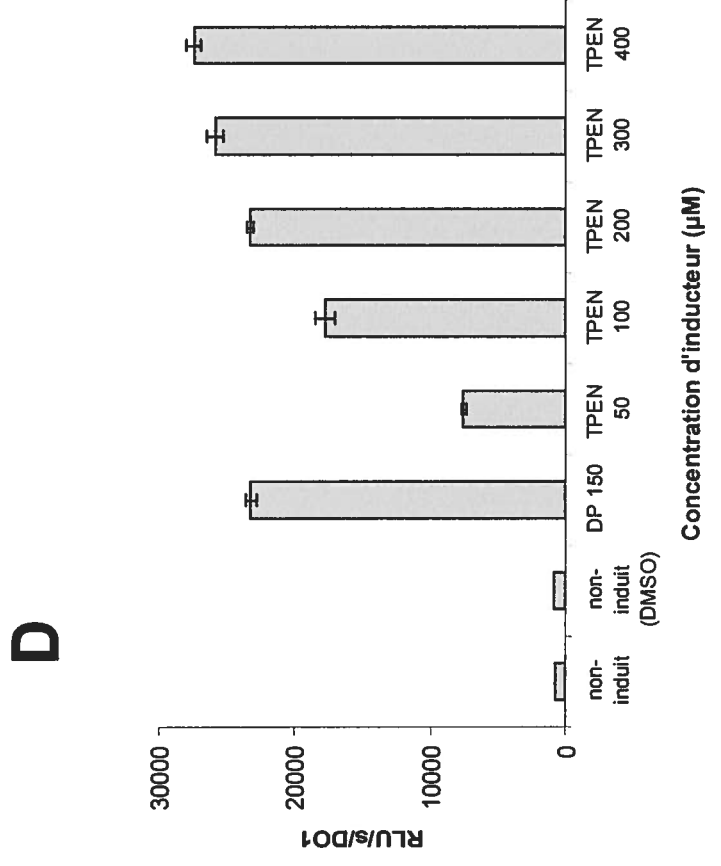
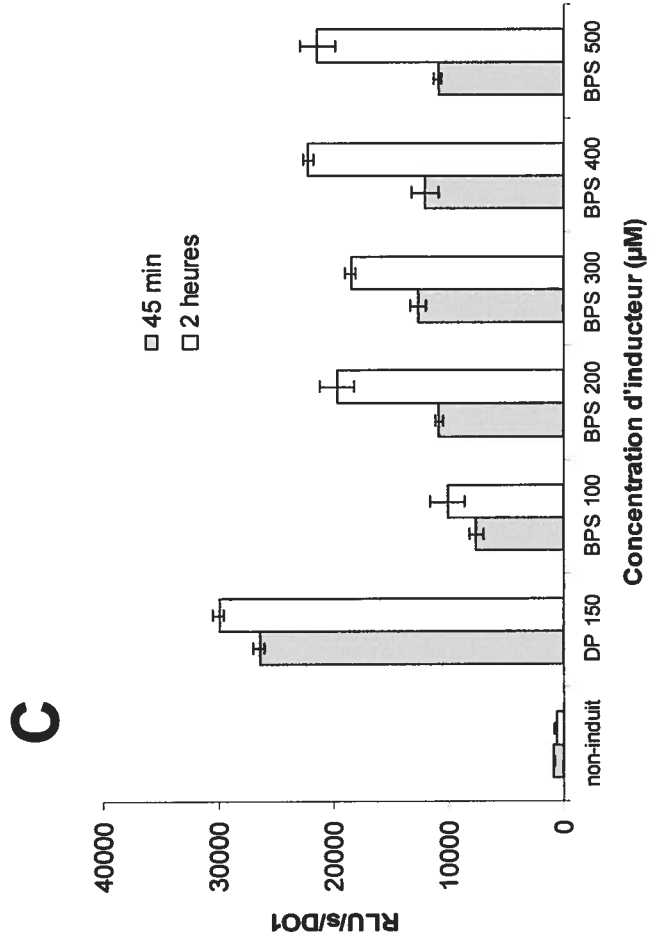
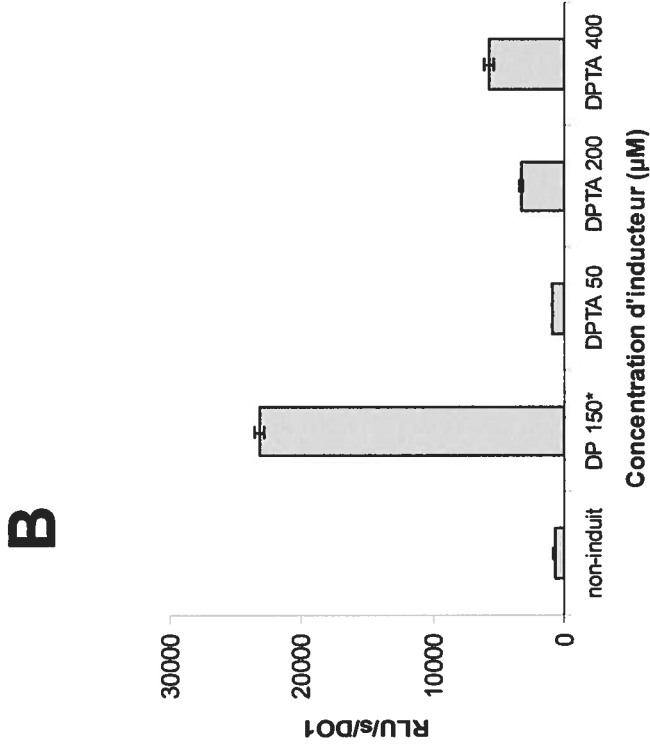
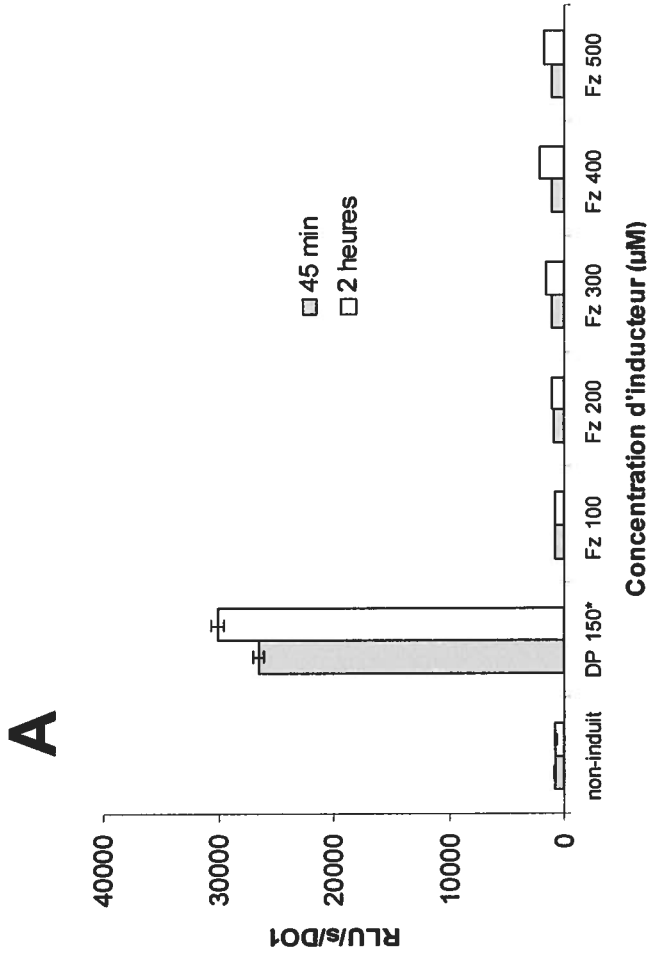
A**B**

Le 2,2'-dipyridyl est un composé qui peut diffuser au travers des membranes biologiques (Petrat *et al.*, 2001). Ce chélateur peut donc complexer autant les cations divalents intra-cellulaires que ceux qui se trouvent dans le milieu de culture. Nous avons voulu comparer l'action du DP avec des chélateurs de métaux qui ne pénètrent pas à l'intérieur des cellules. Nous avons donc exposé la souche PmntH à une gamme de concentrations d'acide 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phénylesulfonique)-1,2,4-triazine (Ferrozine, Fz), d'acide bathophénanthroline disulfonique disodique (BPS), et d'acide 1,3-diaminopropane-N,N,N',N'-tétra-acétique (DPTA). La ferrozine et le BPS ont une affinité particulière pour le fer ferreux (Lurdes *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). L'affinité du DPTA pour les ions métalliques est moins bien documentée. L'incubation en présence de Fz n'entraîne pas d'induction significative de la fusion *PmntH-luc*, et ceci même après deux heures d'incubation (figure 8A). L'incubation en présence du chélateur DPTA entraîne une légère induction, équivalente à environ 25% de l'activité obtenue en présence de DP (figure 8B). Les résultats présentés à la figure 8C démontrent qu'une induction de 45 minutes en présence de 500 μM de BPS cause une dé-répression de l'activité du gène *mntH* équivalente à environ 50% de l'activité obtenue avec 150 μM de DP. Si le temps d'induction est augmenté à deux heures, l'activité maximale obtenue en présence de BPS est d'environ 75% de l'activité obtenue en présence de DP pour la même période d'induction. Afin de confirmer que l'efficacité du DP en tant que chélateur est due au fait que celui-ci diffuse au travers de la membrane, nous avons vérifié l'effet du N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridyl-méthyl)éthylènediamine (TPEN), un autre chélateur de métaux perméable aux membranes et présentant une affinité particulière pour le Zn^{2+} (Arslan *et al.*, 1985; Treves *et al.*, 1994). Les résultats présentés à la figure 8D démontrent que le TPEN est aussi efficace que le DP pour induire l'activité de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc*.

4.3 Rôle du répresseur Fur dans la régulation du gène *mntH*

Puisque la protéine MntH_{Ec} peut transporter le fer, et que le gène est induit par la présence de chélateurs de métaux, nous avons voulu vérifier le rôle du répresseur Fur dans la régulation de *mntH*. Une mutation dans le gène *fur* a été introduite dans la souche

Figure 8. Activité de la fusion *PmntH-luc* en présence de chélateurs de métaux. A-D)
Les bactéries en phase exponentielle ont été exposées à une gamme de concentrations de chélateurs et l'activité a été mesurée après 45 minutes et/ou deux heures d'incubation. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas lors d'une expérience représentative pour chaque chélateur. *Les valeurs pour le DP sont celles obtenues lors de l'expérience en présence de BPS pour A) et celles obtenues lors de l'expérience en présence de TPEN pour C). Les résultats de ces expériences ont été confirmés par ceux obtenus par la stagiaire Evelyn Castillo (été 2002).



PmntH par transduction à l'aide du phage P1 (souche nommée PmntHfur, voir tableau 1). L'activité du promoteur de *mntH* en présence de la mutation *fur* a été mesurée en début de croissance exponentielle. Dans ces conditions, l'activité de la fusion *PmntH-luc* est environ 4 fois plus élevée dans la souche PmntHfur que dans PmntH (figure 9A). Ce résultat nous indique que le répresseur Fur joue probablement un rôle dans la répression du gène *mntH*. La régulation du gène *mntH* par Fur a aussi été mise en évidence par des expériences de transport de manganèse dans des cellules de *E. coli* en phase exponentielle (figure 9B). En milieu riche, le transport de Mn dans *E. coli* est fortement réprimé, de sorte qu'on ne distingue aucune différence entre la souche originelle et un mutant *mntH*. Par contre, dans une souche où le gène *fur* a été inactivé, le transport de Mn dans les cellules est au moins deux fois plus élevé que dans la souche originelle. Cette augmentation de transport disparaît dans un double mutant *mntH fur*. Par contre on amplifie l'effet de la mutation *fur* sur le transport de Mn si on ré-introduit le gène *mntH* sur un plasmide multi-copies. Le protonophore de membrane CCCP a été utilisé comme contrôle négatif lors de ces expériences, puisque le transport de manganèse par MntH est dépendant du proton (Makui *et al.*, 2000).

4.4 Régulation de *PmntH-luc* par les métaux: comparaison des souches PmntH et PmntHfur

Afin de déterminer la spécificité du métal complexé par le DP et l'effet de divers métaux sur la régulation de *PmntH*, une gamme de concentrations de métaux divalents ont été pré-incubées avec 150µM de DP avant le contact avec les souches PmntH et PmntHfur. Les inductions ont été effectuées sur des cultures en phase exponentielle en milieu LB. Les résultats présentés à la figure 10 démontrent que l'effet du DP sur le promoteur de *mntH* peut être annulé par la présence de métaux divalents tels le Fe²⁺, le Mn²⁺ et le Co²⁺. La concentration de métal nécessaire pour annuler l'effet du DP semble dépendre de l'affinité du DP pour le métal en question (Fe²⁺ > Co²⁺ > Mn²⁺). On remarque aussi une différence dans la régulation par les métaux entre les souches PmntH et PmntHfur lorsque le DP est incubé en présence de Fe²⁺ ou Co²⁺. Par contre, les deux souches se comportent de façon similaire lorsque le DP est incubé en présence de Mn²⁺. Ces résultats semblent indiquer que le DP agit sur au moins deux métallos-répresseurs : le

Figure 9. Contribution de la protéine Fur à la régulation du gène *mntH*. A) Comparaison de l'activité de la fusion *PmntH-luc* de bactéries en phase exponentielle, en présence ou absence du gène *fur*. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de trois expériences indépendantes. B) Transport de Mn^{2+} par des souches incubées jusqu'au début de phase exponentielle en LB. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de deux expériences indépendantes. Voir la section « matériel et méthodes » pour plus de détails.

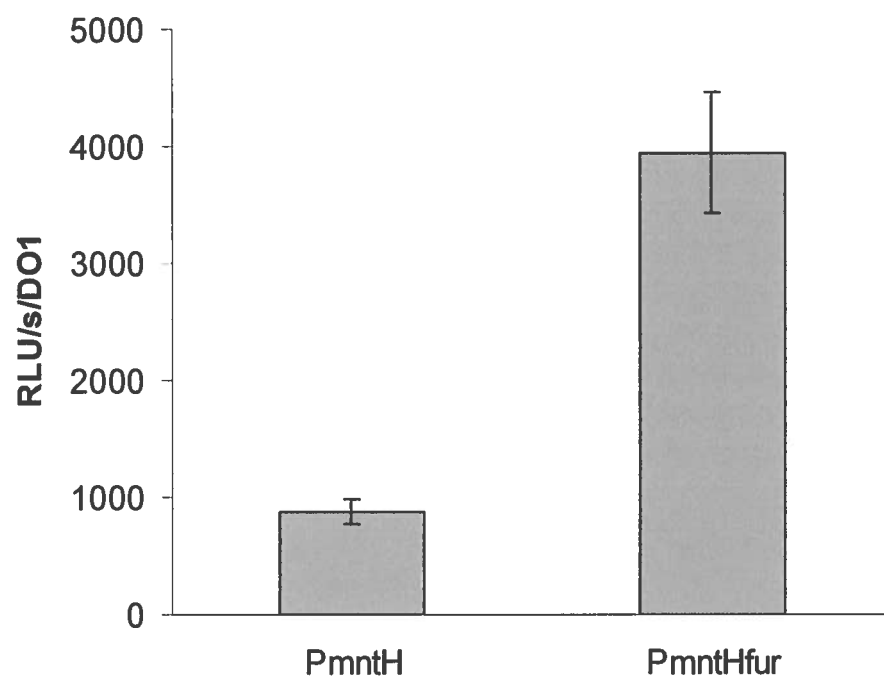
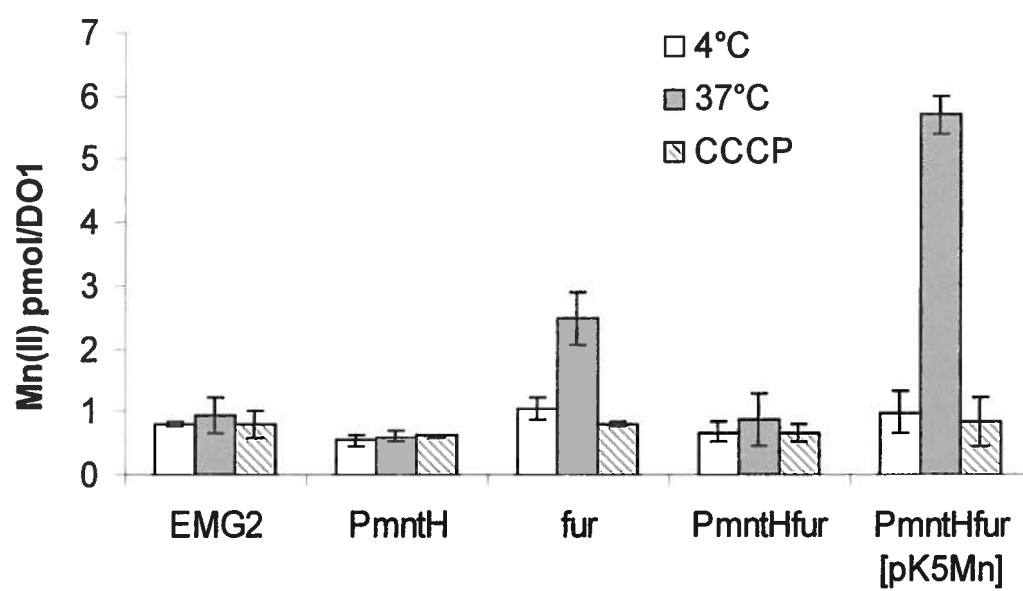
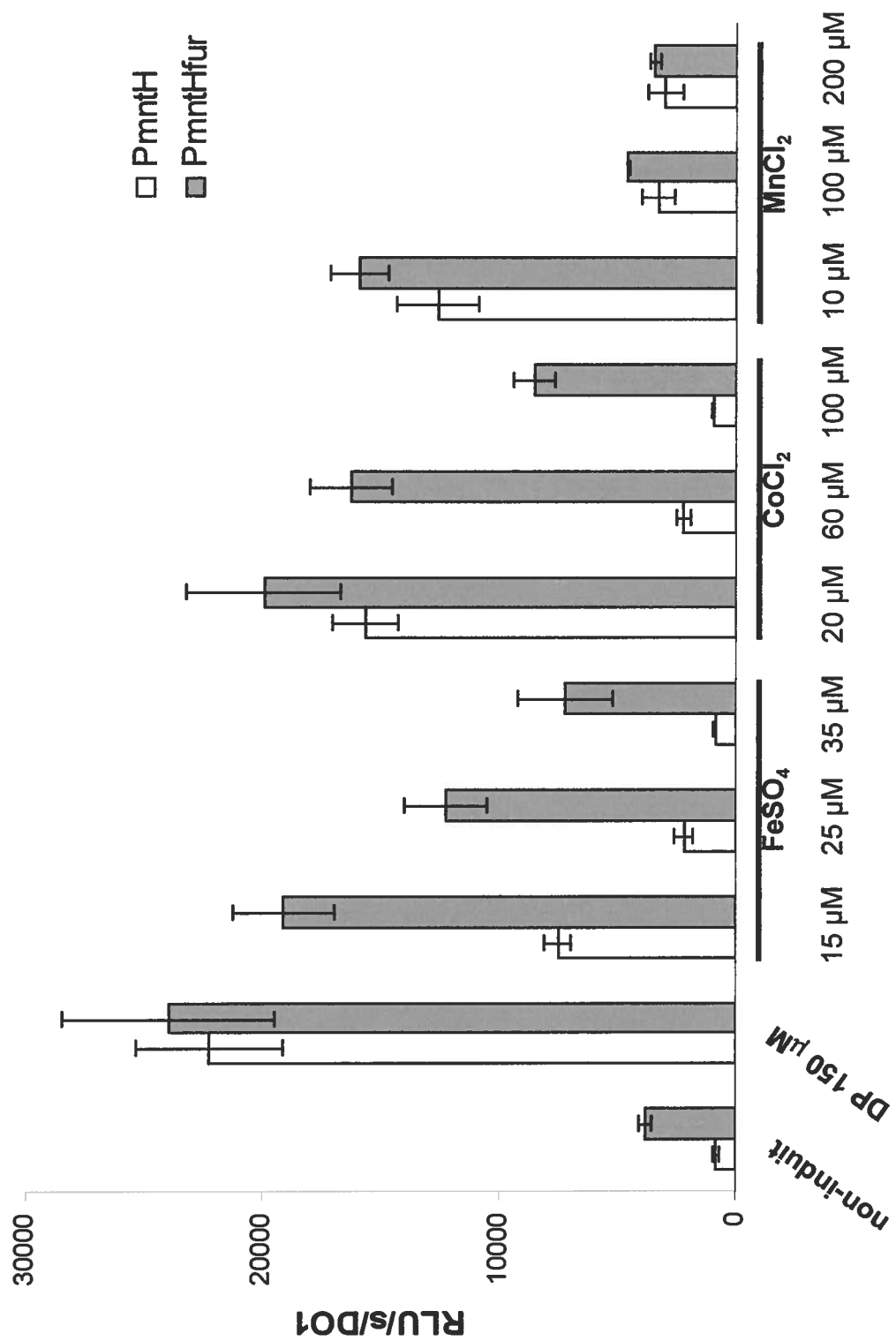
A**B**

Figure 10. Effet des métaux divalents sur la capacité du DP à induire la fusion *PmntH-luc*. Les métaux ont été pré-incubés avec le DP pendant 30 minutes avant l'induction de cultures en phase exponentielle. L'activité de la fusion *PmntH-luc* a été mesurée après 45 minutes d'induction. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas obtenue lors d'une expérience représentative.



répresseur Fur serait impliqué dans la régulation de PmntH par le fer et le cobalt mais un autre facteur de transcription serait impliqué dans la régulation par le manganèse.

4.5 Régulation de *PmntH-luc* en milieu minimal: comparaison des souches PmntH et PmntHfur

Les expériences de régulation en milieu riche et en présence de DP sont compliquées par le fait que le milieu n'est pas entièrement défini et que le DP peut complexer plus d'un métal. Pour ces raisons, les expériences de régulation par les métaux ont été poursuivies dans un milieu minimal défini (milieu G/M), dans lequel la quantité totale de métaux divalents a pu être contrôlée. Les résultats présentés à la figure 11 démontrent que l'activité de PmntH est réprimée lorsque le Fe^{2+} est abondant (10 μM). Par contre, la dé-répression est maximale en présence de concentrations limitantes de Fe^{2+} (100 nM). L'activité du promoteur du gène *mntH* dans la souche PmntHfur est légèrement dé-réprimée par rapport à la souche PmntH en conditions riches en Fe^{2+} , tel qu'il avait été observé pour les expériences en milieu LB. Aux concentrations intermédiaires de 1 μM et 500 nM, la dé-répression est amorcée dans la souche PmntH et non dans la souche PmntHfur. Par contre, à une concentration de 100 nM de Fe^{2+} , l'activité est similaire dans les deux souches. Ces résultats semblent indiquer que la protéine Fur ne serait pas le seul répresseur Fe-dépendant qui contrôle l'expression de *mntH*.

L'effet du cobalt sur l'expression du promoteur a aussi été mesuré en milieu G/M. Les résultats d'expression présentés à la figure 12 démontrent que l'activité de la fusion *PmntH-luc* est réprimée par le Co^{2+} , mais seulement en présence du répresseur Fur. Ceci indique que l'effet du cobalt sur le promoteur du gène *mntH* est entièrement médié par Fur.

Finalement, l'effet du Mn^{2+} sur l'activité de la fusion *PmntH-luc* a été mesuré. Les souches étudiées dans ces expériences ont été transformées avec le plasmide pK5Mn, qui exprime le gène *mntH*, afin d'éviter une sur-estimation des quantités de manganèse requises pour réprimer le gène. Les résultats d'expression présentés à la figure 13 démontrent que l'activité du promoteur est réprimée en présence de Mn^{2+} ,

Figure 11. Effet de la concentration de Fe^{2+} sur l'activité de la fusion *PmntH-luc*. Les souches de *E. coli* ont été acclimatées pendant 24 heures dans du milieu G/M riche en fer ($10 \mu\text{M Fe}^{2+}$). Les bactéries ont ensuite été repiquées et incubées pendant 16 heures dans le même milieu contenant des concentrations décroissantes de Fe^{2+} , après quoi l'activité de *PmntH-luc* a été mesurée. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas dans une expérience représentative.

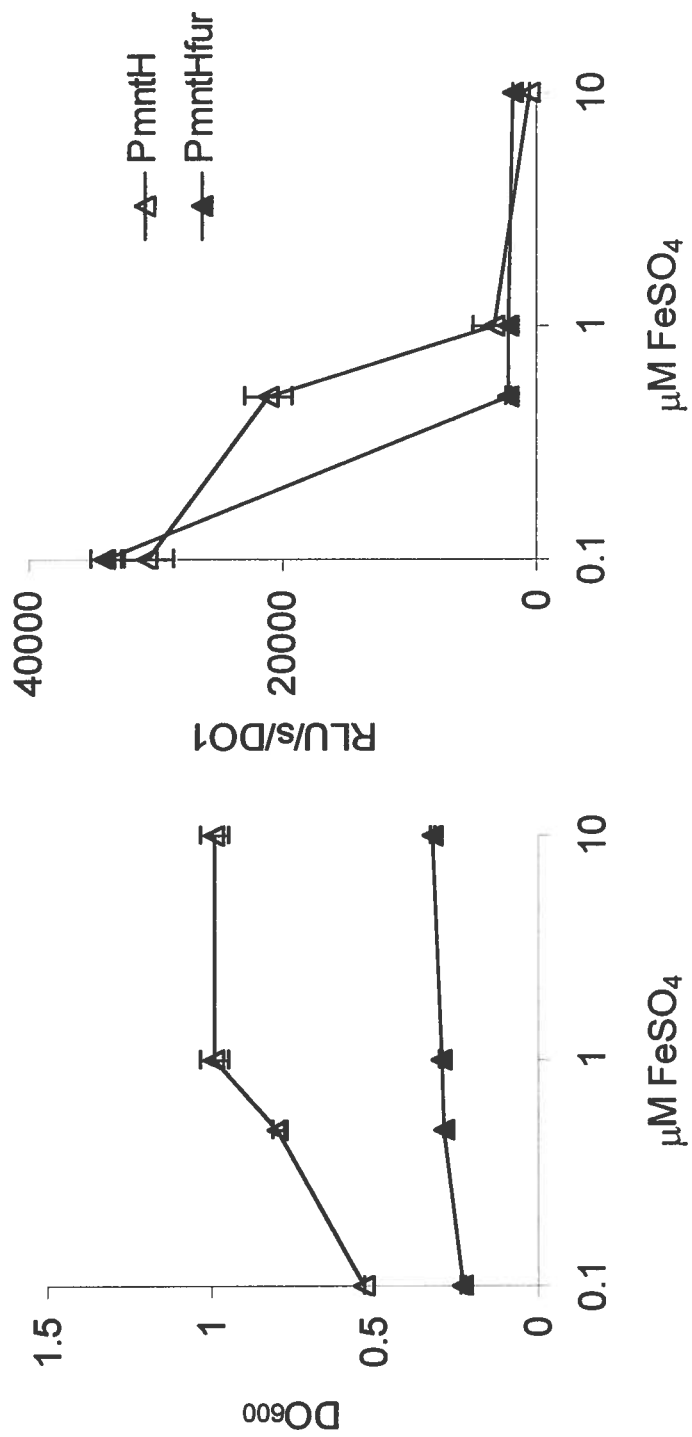


Figure 12. Effet du Co^{2+} sur l'activité de la fusion *PmntH-luc*. Les souches ont été incubées pendant 24 heures en milieu minimum G/M contenant $10 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} . Les cultures ont ensuite été repiquées et incubées pendant 16 heures dans du milieu G/M contenant 100 nM de Fe^{2+} , $7,5 \mu\text{M}$ de Mn^{2+} (pour corriger le défaut de croissance de la souche *PmntHfur*) et différentes concentrations de Co^{2+} , et l'activité du promoteur a été mesurée. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas dans une expérience représentative.

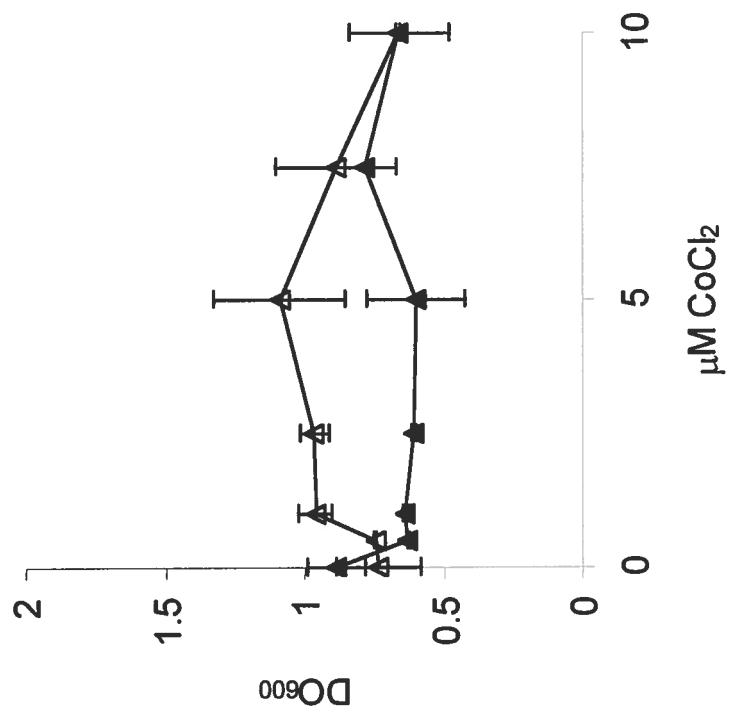
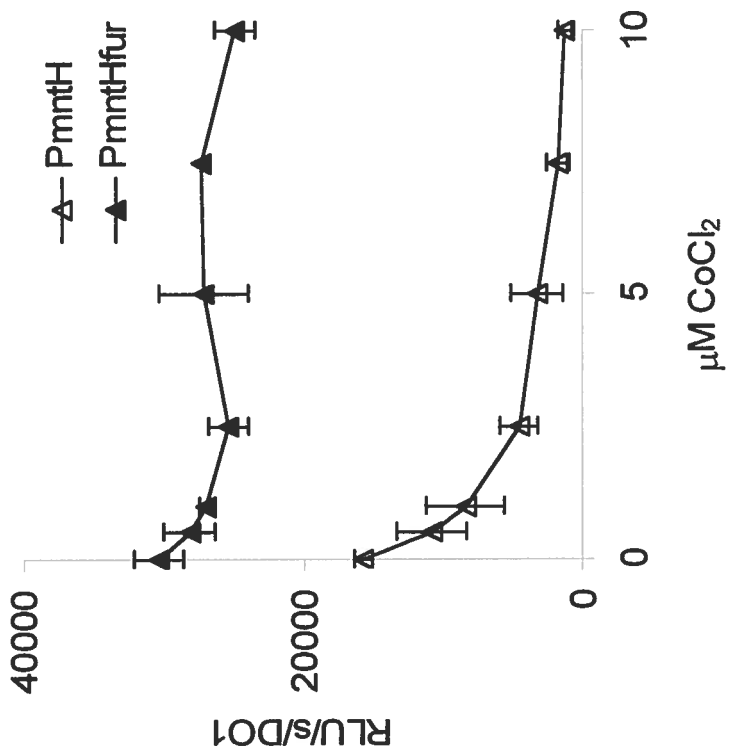
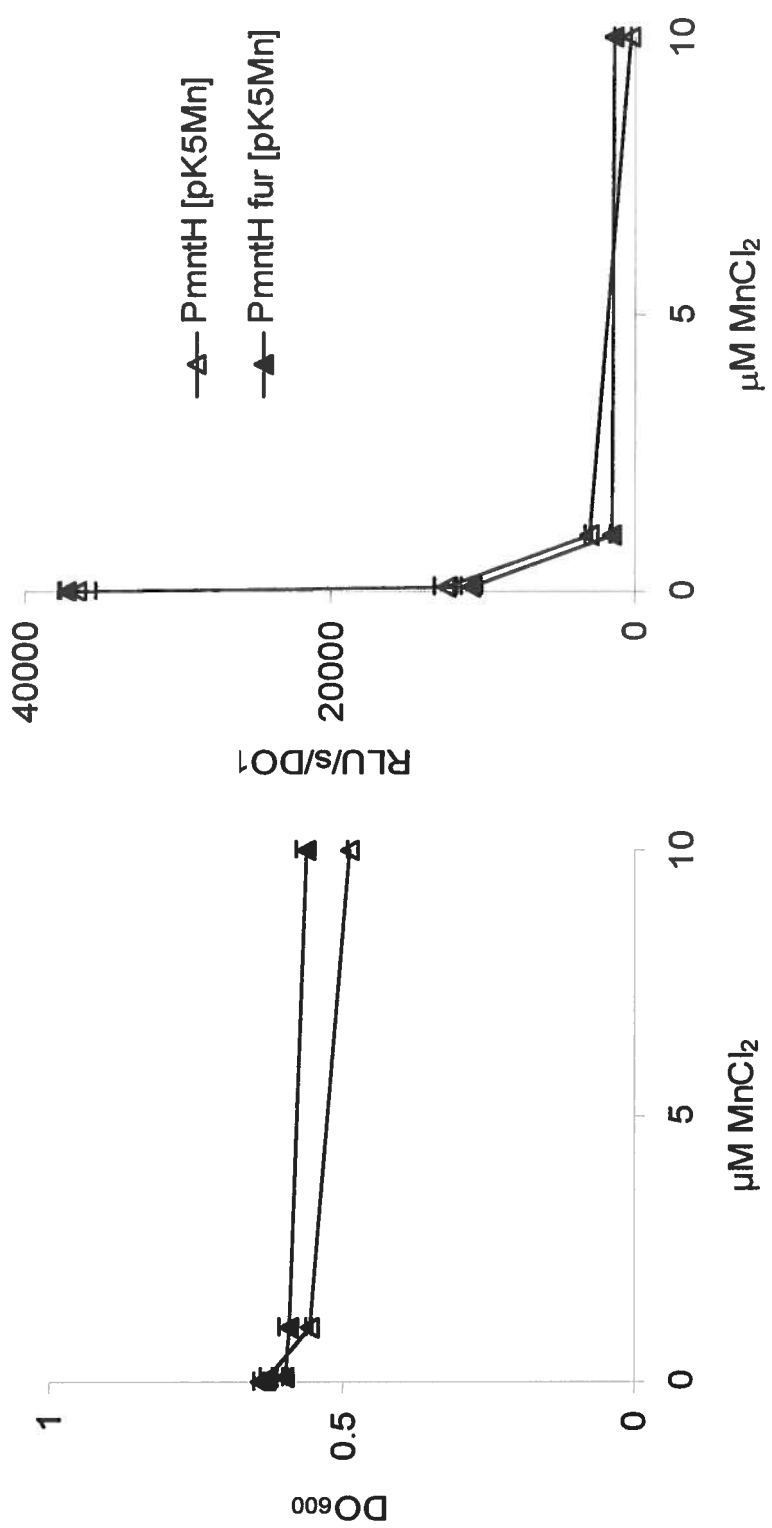


Figure 13. Effet du Mn^{2+} sur l'activité de la fusion *PmntH-luc*. Les souches *PmntH* et *PmntHfur* complémentées par l'expression du gène *mntH* (plasmide pK5Mn) ont été incubées pendant 24 heures en présence de 10 μM de Fe^{2+} . Les cultures ont ensuite été repiquées et incubées pendant 16 heures dans du milieu G/M contenant 100 nM de Fe^{2+} et différentes concentrations de Mn^{2+} , après quoi le niveau d'activité a été mesuré. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas dans une expérience représentative.



indépendamment de la présence du répresseur Fur. On peut donc supposer que l'effet du Mn^{2+} sur le promoteur de *mntH* est médié par un répresseur autre que Fur. Les résultats obtenus pour la régulation par les métaux en milieu minimal sont en accord avec ceux obtenus en présence de DP.

4.6 Régulation de *PmntH-luc* en milieu minimal: effet de l'absence de manganèse

Il est curieux que le gène *mntH*, dont le produit est un transporteur de manganèse, soit régulé en grande partie par le fer. En effet, la régulation par le manganèse est observable uniquement en conditions de privation en fer, lorsque le gène est déjà déréprimé. Nous n'ajoutons pas de manganèse lors de la préparation du milieu G/M. Toutefois, il est possible que celui-ci contienne tout de même des traces de manganèse, et que celles-ci soient suffisantes pour maintenir la répression du gène. Ceci est peu probable compte tenu que la quantité d'ions Mn signalée pour les autres produits entrant dans la confection du milieu G/M est négligeable. Il se peut aussi que le manganèse emmagasiné par les cellules lors de la pré-culture en milieu riche persiste en quantités suffisantes pour réprimer le gène même après deux repiquages en milieu G/M. Nous avons donc tenté d'épuiser les réserves de manganèse du milieu en effectuant plusieurs repiquages de la souche *PmntH*. Nous avons comparé l'activité de *PmntH-luc* dans le milieu G/M tel qu'il avait été préparé pour les expériences précédentes et dans du milieu G/M auquel une solution de micro-éléments contenant du Mn a été ajoutée. Les résultats de cette expérience démontrent que, même après neuf jours, l'activité de la fusion ne semble pas être affectée par l'absence de manganèse dans le milieu (figure 14). Il serait toutefois important de doser le manganèse dans le milieu avant de pouvoir conclure que l'activité de la fusion n'est pas affectée par l'absence de manganèse.

4.7 Effet du peroxyde d'hydrogène sur l'expression de *PmntH-luc*

Les résultats de recherches portant sur le gène *mntH* de *S. typhimurium* ont démontré que celui-ci est induit en présence de peroxyde d'hydrogène (Kehres *et al.*, 2000). De plus, nos propres expériences ont démontré que les mutants *mntH* sont plus

Figure 14. Effet de l'absence de manganèse sur la régulation de *PmntH-luc* en milieu minimum. Les souches ont été incubées en milieu minimum riche en fer en présence ou absence de micro-éléments (comprenant le Mn) pendant 9 jours. Les cultures ont été repiquées dans du milieu frais à toutes les 24 heures et l'activité de la fusion *PmntH-luc* a été mesurée à tous les deux jours après une vérification au premier jour. Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas.

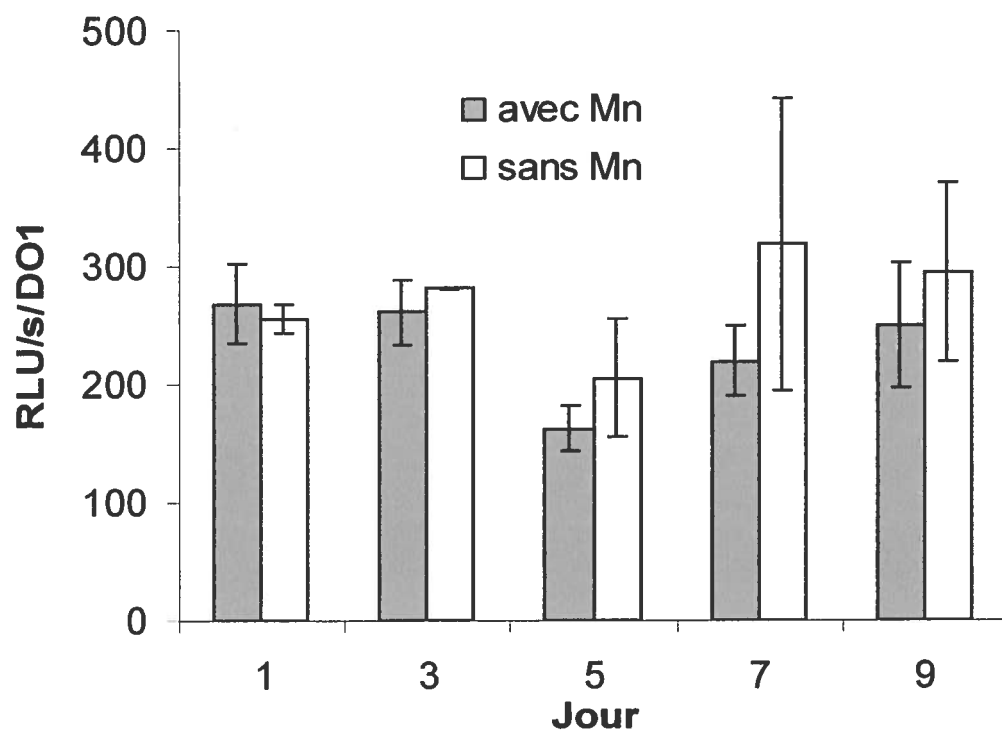
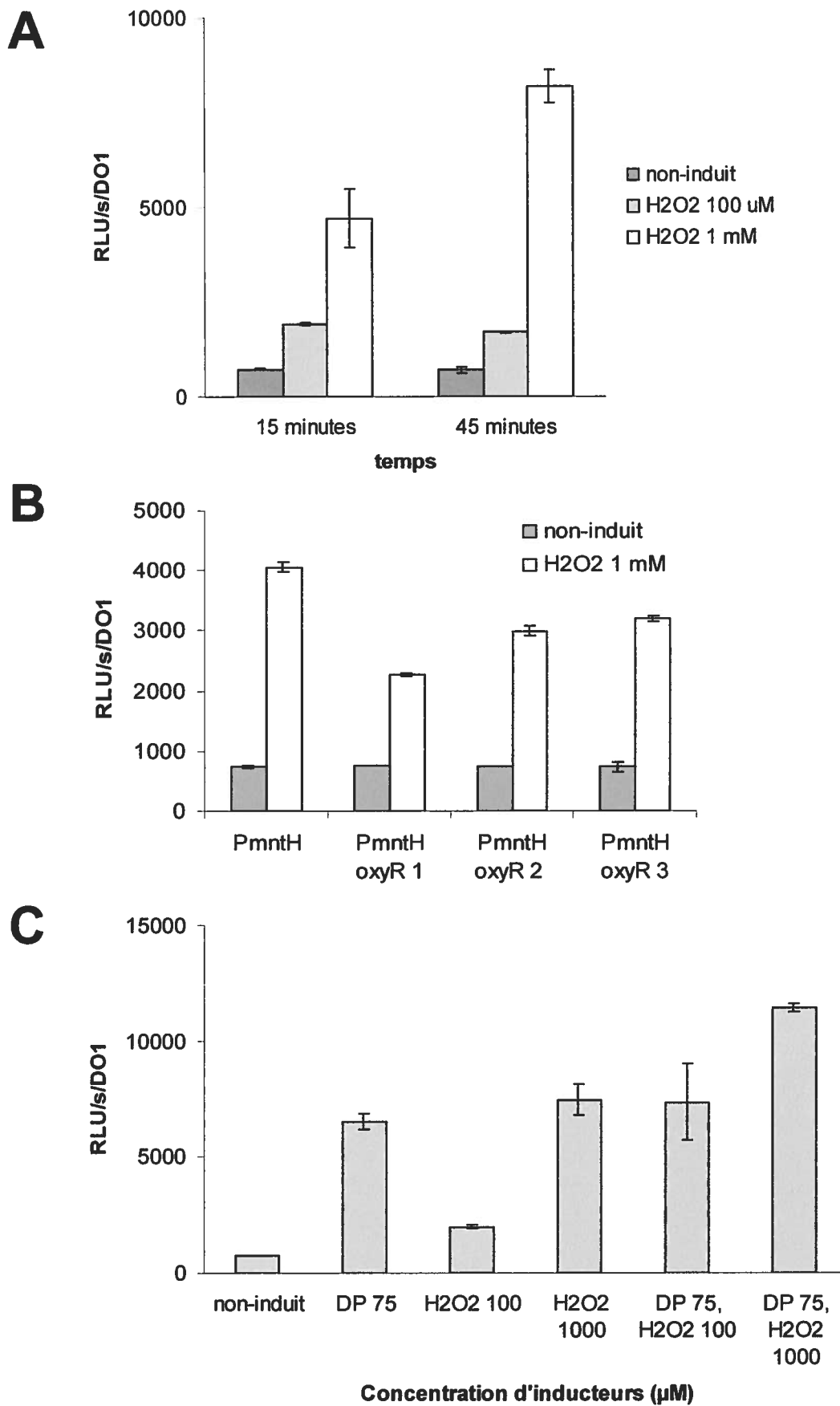


Figure 15. Induction du gène *mntH* par le peroxyde d'hydrogène. A) Effet du peroxyde d'hydrogène sur l'expression de la fusion *PmntH-luc*. La souche *PmntH* a été incubée en milieu riche contenant 100 μM ou 1 mM de H_2O_2 et l'activité du promoteur a été mesurée après 15 et 45 minutes d'incubation. B) Effet de l'absence du facteur OxyR sur l'induction de *PmntH-luc* par le peroxyde d'hydrogène. Des mutants *PmntH oxyR* en phase exponentielle ont été incubés pendant 45 minutes en présence de H_2O_2 avant la mesure de l'activité de la fusion *PmntH-luc*. C) Effet de la combinaison de DP et H_2O_2 sur l'expression de la fusion *PmntH-luc*. La souche *PmntH* en phase exponentielle a été incubée pendant 45 minutes en présence de différentes concentrations de DP, H_2O_2 , ou d'une combinaison des deux agents. Les barres d'erreur dans les trois graphiques représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas.



sensibles au peroxyde d'hydrogène que la souche originelle (voir section 4.10). Nous avons donc voulu vérifier si le gène de *E. coli* est aussi induit par le H₂O₂. Les résultats présentés à la figure 15A démontrent que la fusion *PmntH-luc* est significativement induite en présence de 1 mM de peroxyde d'hydrogène. Puisque le facteur de transcription OxyR active plusieurs gènes en réponse au stress causé par le peroxyde d'hydrogène, nous avons voulu vérifier son implication possible dans l'induction du gène *mntH* en présence de H₂O₂. Nous avons donc créé des mutants *PmntH oxyR* en transduisant une mutation *oxyR* dans la souche *PmntH* à l'aide du phage P1. Ces mutants ont été incubés pendant 45 minutes en présence de H₂O₂ et l'activité de la fusion *PmntH-luc* a été mesurée. Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure 15B. Bien que l'induction en présence de peroxyde d'hydrogène soit légèrement plus faible dans les trois mutants *oxyR* que dans la souche *PmntH*, celle-ci n'est pas complètement abolie. Le gène *mntH* étant induit en présence de chélateurs de métaux et en présence de H₂O₂, nous avons voulu vérifier si les effets de ces agents sur l'expression du gène sont cumulatifs ou mutuellement exclusifs. Des expériences préliminaires avec de fortes doses de DP et de H₂O₂ n'avaient pas permis de démontrer d'effet cumulatif. Par contre, il est possible que les fortes doses de ces agents aient entraîné trop de mort cellulaire pour que la mesure soit valable (résultats non présentés). Nous avons donc décidé d'incuber la souche *PmntH* en présence de doses sub-optimales de DP et de H₂O₂, afin de mieux observer un effet cumulatif possible de ces agents sur l'expression. Les résultats de ces expériences sont présentés à la figure 15C. On constate que l'effet de la combinaison de 75 µM de DP et 100 µM de H₂O₂ ne sont pas additifs. L'effet de 75 µM de DP et 1 mM de H₂O₂ est plus prononcé que l'effet de chaque inducteur seul, par contre l'activité ne représente pas un cumul des deux effets. Il semble donc que les effets de ces agents sur la régulation de l'expression de *mntH* soient mutuellement exclusifs.

4.8 Liaison de la protéine Fur au promoteur du gène *mntH*

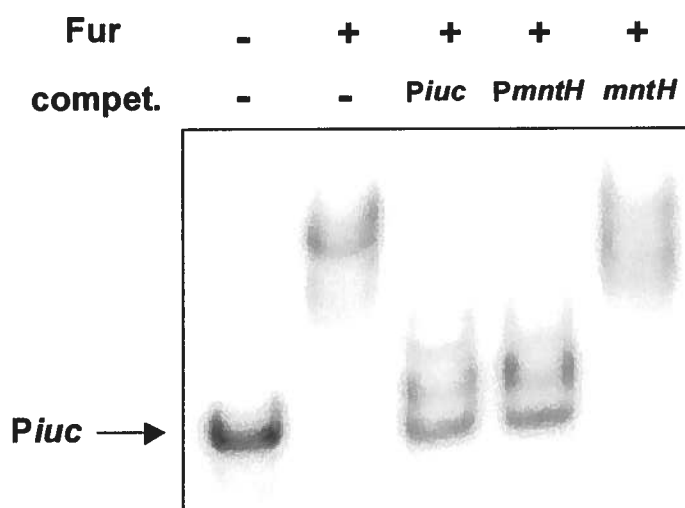
Les études de régulation à l'aide de gènes rapporteurs permettent l'identification de facteurs qui sont impliqués dans la régulation. Par contre, elles ne permettent pas de démontrer directement que le facteur se fixe aux séquences en amont d'un gène. Les

effets observés pourraient effectivement être indirects. À titre d'exemple, on peut envisager que la dé-répression du gène *mntH* en l'absence du répresseur Fur pourrait être causée par la dé-répression d'un gène dont le produit est un activateur qui peut se lier au promoteur de *mntH*, et non par un effet direct de Fur sur *mntH*. Nous avons donc mesuré directement la liaison de la protéine Fur purifiée au promoteur de *mntH* à l'aide de la technique du retard sur gel. Nous avons d'abord vérifié la capacité du promoteur de *mntH* à agir en tant que compétiteur lorsque Fur est lié à un promoteur pour lequel son affinité a déjà été démontrée. Pour ces expériences, nous avons utilisé un fragment de 170 pb comprenant le promoteur de l'opéron *iucABCDiutA* (*Piuc*) (Dubrac et Touati, 2002). Ce fragment a été marqué au [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP et incubé en présence de Fur et d'un excès de fragments d'ADN non marqué. Les résultats de cette expérience démontrent qu'un fragment comprenant le promoteur de *mntH* agit en tant que compétiteur, puisque la présence d'un excès de ce fragment empêche la liaison de Fur au fragment *Piuc* (voir figure 16A). Un fragment de la même longueur mais provenant de l'intérieur du gène *mntH* n'agit pas en tant que compétiteur, ce qui indique que la compétition observée avec le fragment *PmntH* est spécifique. Afin de mesurer directement l'affinité de Fur pour le promoteur de *mntH*, une région d'environ 170 pb incluant le promoteur de *mntH* ainsi que le site de liaison de Fur prédit par Patzer et Hantke (2001) a été amplifiée par PCR. Le fragment a été marqué et incubé avec différentes concentrations de protéine Fur purifiée (de 10 nM à 250 nM). L'affinité de Fur pour le promoteur de *mntH* et son affinité pour le promoteur de l'opéron *iucABCDiutA* ont été comparées. Les résultats présentés à la figure 16B démontrent que l'affinité du répresseur Fur pour le *PmntH* est plus faible que pour *Piuc*, puisque la concentration nécessaire pour obtenir le maximum de retard sur gel est environ 5 fois plus élevée dans le cas de *PmntH*.

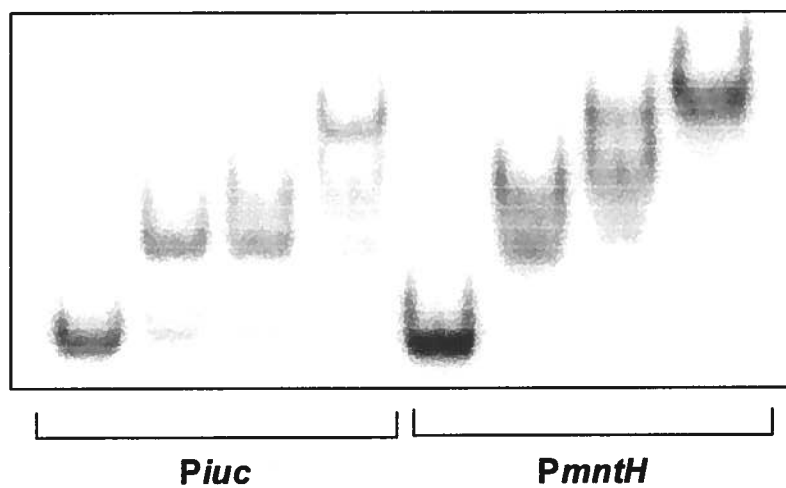
4.9 Le défaut de croissance de la souche *PmntHfur* est corrigé en présence de Mn ou par la sur-expression du gène *mntH*

Lors des expériences de régulation en milieu minimum, nous avons observé que la souche *PmntHfur* présente un défaut de croissance significatif par rapport à la souche

Figure 16. Liaison du répresseur Fur au promoteur de *mntH*. A) Compétition par le promoteur de *mntH* (*PmntH*) de la liaison de Fur au promoteur de l'opéron *iucABCDiutA* (*Piuc*). 0,4 ng de fragment *Piuc* marqué a été incubé à 37°C pendant 15 minutes avec 50 nM de protéine Fur et 20 ng de compétiteur (compet.) froid, dans un tampon contenant 100 µM de MnCl₂. *mntH* = fragment interne au gène *mntH*. B) Affinité de Fur pour le promoteur de *mntH*. 0,4 ng de fragments marqués *PmntH* et *Piuc* ont été incubés tel que décrit pour A en présence des concentrations indiquées de protéine Fur.

A**B**

Fur (nM)	0	10	20	50	0	50	100	250
----------	---	----	----	----	---	----	-----	-----



PmntH (comparaison des densités optiques obtenues pour les deux souches à la figure 11). Ce défaut de croissance peut être corrigé lorsque le gène *mntH* est ajouté sur un plasmide multi-copies (voir densités optiques pour la figure 13) ou sur un plasmide à faible nombre de copies (voir figure 17A). Par contre la figure 17A démontre que l'effet de complémentation par le plasmide pGBmntHEc est éliminé lorsqu'on crée une délétion interne dans le gène *mntH* (plasmide pGBmntHEc Δ). Le défaut de croissance de la souche PmntHfur peut aussi être corrigé en ajoutant du manganèse au milieu (voir densités optiques pour la figure 12). Le défaut de croissance observé est attribuable à la combinaison des deux mutations, puisque des simples mutants *mntH* et *fur* ne manifestent pas de défaut de croissance significatif par rapport à la souche originelle (résultats non présentés). Nous croyons que le défaut de croissance du double mutant PmntHfur est causé par un stress oxydatif dû à l'accumulation de deux effets: le premier serait causé par la dé-répression du transport de fer dû à la mutation *fur*, ce qui favorise la réaction de Fenton; le second serait causé par un manque de manganèse, dû à la mutation *mntH*, ce qui diminuerait la résistance au stress oxydatif en rendant la Mn-SOD inactive. Afin de tester cette hypothèse, nous avons voulu déterminer si une mutation dans le gène *sodB*, dont le produit est la Fe-SOD, la seule autre SOD cytoplasmique de *E. coli*, entraînerait un défaut de croissance encore plus marqué dans le mutant PmntHfur. Nous avons donc créé une souche PmntHfursodB par transduction à l'aide du phage P1, et nous avons en effet observé un défaut de croissance encore plus important que pour le double mutant PmntHfur (figure 17B).

4.10 Sensibilité au stress oxydatif des mutants *mntH*

Puisque nous croyons que le défaut de croissance en milieu minimal de la souche PmntHfur est causé par un stress oxydatif, nous avons employé des agents induisant un stress oxydatif intracellulaire afin de déterminer si l'absence du gène *mntH* rend les bactéries plus sensibles. La sensibilité au stress oxydatif due à la mutation *mntH* a donc été mesurée par un test de diffusion sur milieu solide. Des bactéries en phase de croissance exponentielle ont été étalées sur milieu riche en présence d'un filtre imprégné d'une solution de H₂O₂. Le diamètre de la zone d'inhibition de croissance a été mesuré après 16 heures d'incubation. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le

Figure 17. La souche PmntHfur présente un défaut de croissance en milieu minimum. A) Correction du défaut de croissance de la souche PmntHfur par l'expression du gène *mntH* à partir d'un plasmide à faible nombre de copies. B) Une mutation dans le gène *sodB* accentue le défaut de croissance de la souche PmntHfur. La densité optique pour les deux graphiques a été mesurée après 24 heures d'incubation en milieu minimum contenant 10 μM de FeSO_4 . Les barres d'erreur représentent l'écart-type calculé sur la moyenne de duplicatas dans une expérience représentative, sauf pour la souche PmntHfur *sodB*, où l'écart-type a été calculé sur la moyenne de la croissance de trois souches indépendantes. La description des souches et des plasmides utilisés se trouve dans le tableau 1.

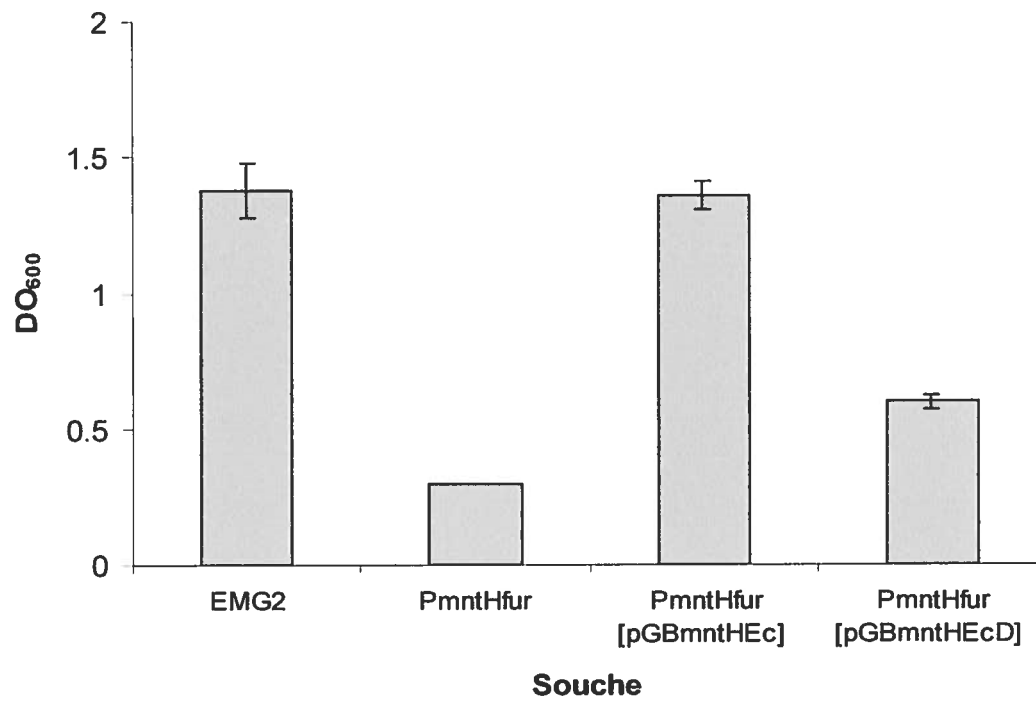
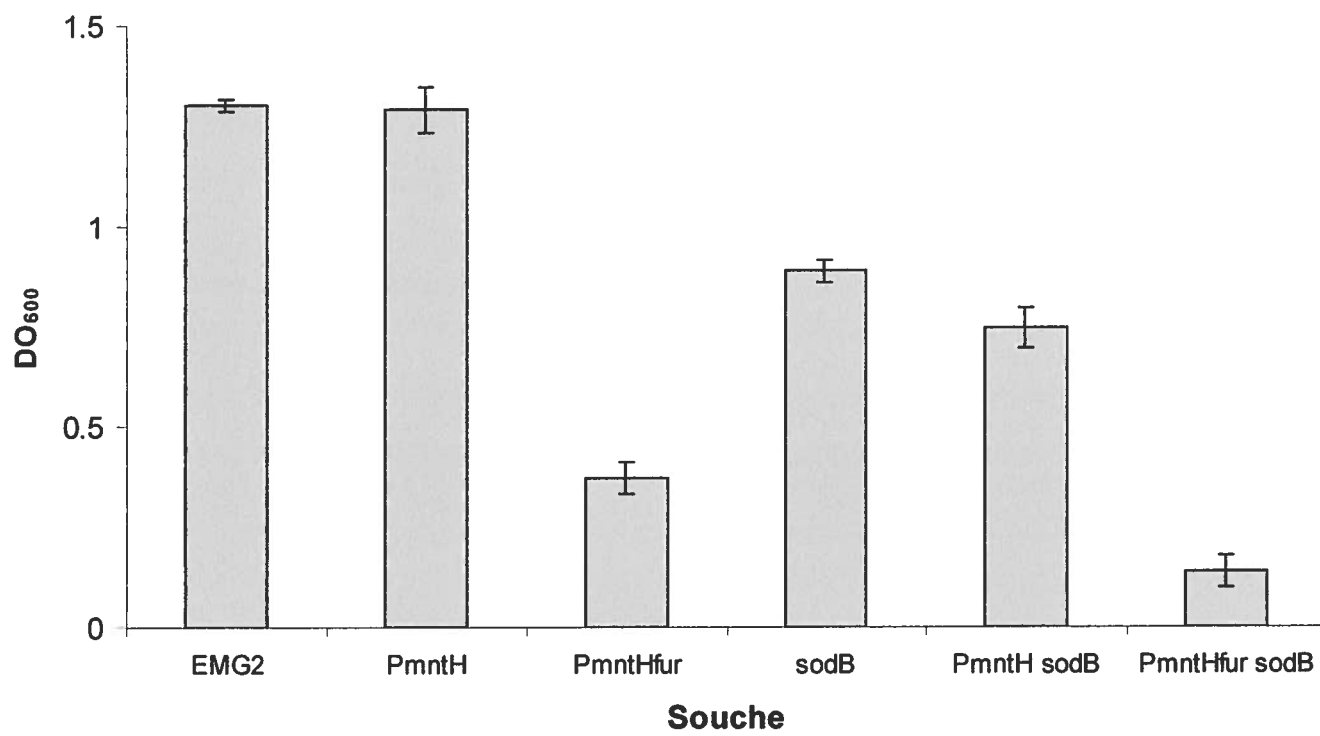
A**B**

tableau 3. Les souches *oxyR* et *fur* ont été utilisées comme contrôles puisque que se sont des souches dont la sensibilité au stress oxydatif est bien connue (Touati, 2000b). On remarque que la sensibilité du mutant *mntH* par rapport à la souche originelle est comparable à celle du mutant *fur*. De plus, l'effet des mutations *mntH* et *fur* est additif puisque le double mutant est plus sensible que les deux simples mutants. La sensibilité au peroxyde d'hydrogène de la souche PmntHfur*sodB* est comparable à celle observée pour la souche PmntH*fur*. Finalement, la sensibilité au stress oxydatif du simple mutant *mntH* peut être corrigée par la supplémentation du milieu avec du Mn^{2+} , ce qui indique que la sensibilité de cette souche est due au manque de manganèse en absence du transporteur MntH.

La sensibilité au paraquat, un générateur d'anions superoxyde dans la cellule, a été évaluée dans les mêmes souches par un test de diffusion semblable à celui utilisé pour le H_2O_2 . Les résultats de ces études sont présentés dans le tableau 4. La souche *mntH* est sensible au paraquat et on observe encore un effet cumulatif des mutations *fur* et *mntH* sur la sensibilité au stress oxydatif.

Tableau 3- Sensibilité de différentes souches au peroxyde d'hydrogène

Souche/ condition	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
EMG2	23 +/- 0.5
<i>oxyR</i>	43 +/- 1 *
<i>fur</i>	25 +/- 1
<i>mntH</i>	26 +/- 1
<i>mntH</i> + 1 μM $MnCl_2$	25 +/- 0
<i>mntH</i> + 10 μM $MnCl_2$	23.5 +/- 0.5
<i>mntH</i> + 100 μM $MnCl_2$	22.5 +/- 0.5
PmntH<i>fur</i>	29 +/- 0.5 *
PmntH<i>fur</i> <i>sodB</i>	29 +/- 0.5 *

* différence statistiquement significative par rapport à la souche EMG2

Tableau 4- Sensibilité de différentes souches au paraquat

Souche	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
EMG2	7,5 +/- 0.5
<i>mntH</i>	9 +/- 0.5
<i>fur</i>	10 +/- 0.5
PmntHfur	12 +/- 0.5 *
PmntHfur <i>sodB</i>	12 +/- 0.5 *

* différence statistiquement significative par rapport à la souche EMG2

5. DISCUSSION

Les résultats présentés à la section précédente ont démontré que le gène *mntH* de *E. coli* est régulé par les métaux divalents, en particulier par le fer, et que le répresseur Fur est impliqué dans cette régulation. La liaison du répresseur Fur au promoteur de *mntH* a été vérifiée directement. Le défaut de croissance d'un double mutant *mntH fur* suggère que le gène *mntH* est impliqué dans la résistance au stress oxydatif relié au métabolisme du fer en aérobiose. Cette hypothèse est supportée par les résultats de tests de diffusion sur milieu solide. La signification des résultats obtenus dans le cadre de ce projet sera abordée plus profondément dans les pages qui suivent et ces résultats seront comparés à ceux obtenus par d'autres groupes de recherche ayant étudié la régulation des gènes *mntH*.

La forte induction de *mntH* en réponse à un traitement au DP suggère que le gène est contrôlé par un ou des répresseurs métallo-dépendants. En effet, les chélateurs entraînent une diminution de la concentration de métaux divalents dans le milieu, ce qui cause l'inactivation de répresseurs métallo-dépendants et la dé-répression des gènes qui sont sous leur contrôle s'ensuit. Les études avec différents chélateurs de métaux démontrent que leur capacité à traverser la membrane plasmique affecte grandement leur effet sur l'expression de la fusion *PmntH-luc*. En effet, les deux chélateurs perméables étudiés, le DP et le TPEN, entraînent rapidement une dé-répression majeure de la transcription du gène *mntH*. Par contre, l'action des trois chélateurs de métaux non-perméables, le BPS, la Ferrozine et le DPTA est plus lente et le niveau d'induction obtenu n'atteint pas celui entraîné par le DP ou le TPEN. Il est normal que l'action d'un chélateur perméable à la membrane soit plus rapide, puisque celui-ci peut complexer directement les métaux qui sont liés aux répresseurs. Les chélateurs non-perméables complexent les ions du milieu extra-cellulaire mais n'affectent pas directement le contenu de la cellule. Le manque d'ions se fait donc ressentir seulement après quelques divisions cellulaires, suite au phénomène de dilution. On remarque par contre que les trois chélateurs non-perméables diffèrent plus entre eux dans leur capacité à induire *mntH* que les deux chélateurs perméables. En effet, l'efficacité d'induction du gène par le BPS est plus élevée que celle de la Ferrozine ou du DPTA. Ceci peut probablement être expliqué par les différences d'affinité de ces différents chélateurs pour les ions métalliques. Par

exemple, le BPS et la Ferrozine ont une affinité particulière pour le fer ferreux (Zhang *et al.*, 2000; Lurdes *et al.*, 2002), par contre il est possible que l'affinité du BPS pour cet ion soit plus élevée que celle de la Ferrozine, ou encore que le BPS complexe une plus grande variété d'ions métalliques dont d'autres ions impliqués dans la régulation de *mntH*. L'affinité du DPTA pour les ions métalliques est moins bien documentée. Pour ce qui est des deux chélateurs perméables étudiés, leur affinité pour les métaux diffèrent : le DP a une affinité particulière pour le fer ferreux (Thomas *et al.*, 1985) tandis que le TPEN est utilisé principalement comme chélateur de Zn^{2+} , bien qu'il présente aussi une affinité pour le Fe^{2+} (Treves *et al.*, 1994). On remarque que, malgré les différences de spécificité de ces deux molécules, leur capacité à induire le gène *mntH* est équivalente. Il est possible qu'une fois à l'intérieur de la cellule, la spécificité du chélateur pour les ions soit moins importante, puisque la quantité totale d'ions est moins grande que dans le milieu de culture et la concentration relative des ions diffère aussi. De plus, l'affinité d'un chélateur pour un ion en particulier importe peu si on retrouve très peu de cet ion dans la cellule. La longueur de la période d'incubation serait donc suffisante pour permettre aux deux chélateurs perméables testés d'inactiver tous les répresseurs métallo-dépendants contribuant à la régulation du gène étudié, indépendamment de leur affinité pour les différents métaux. En somme, l'effet de ces deux chélateurs sur l'expression du gène *mntH* serait donc relié à leur capacité de complexer avec affinité le Fe^{2+} .

Les observations de la régulation de la fusion *PmntH-luc* en présence ou en absence du gène *fur* indiquent que le répresseur Fur est impliqué dans la régulation de *mntH*. De plus, l'augmentation du transport de manganèse dans un mutant *fur* permet de confirmer l'implication du répresseur dans la régulation du gène *mntH*. Toutefois, bien que la dé-répression de la fusion transcriptionnelle en absence de Fur soit significative (environ 4 fois le niveau de base), celle-ci est seulement partielle. En effet, si Fur était le seul répresseur modulant l'activité du gène *mntH*, la dé-répression en absence de Fur devrait être équivalente à l'activité maximale observée en présence de chélateurs de métaux (soit environ 40 fois le niveau de base). Cette observation nous permet donc de prédire qu'un ou d'autres répresseurs influencent également la régulation du gène *mntH* de *E. coli*. À la lumière des autres études publiées, le candidat le plus probable pour la

répression de *mntH* serait un homologue du répresseur MntR, qui est impliqué dans la régulation du gène *mntH* de *B. subtilis* (Que et Helmann, 2000). Une protéine homologue à MntR a en effet été identifiée dans le génome de *E. coli* K-12 (Entrez microbial genomes: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/PMGifs/Genomes/micr.html>; Patzer et Hantke, 2001).

Les expériences de régulation où le DP a été pré-incubé avec divers métaux divalents nous ont permis de démontrer deux choses. Premièrement, le fait que la pré-incubation du DP avec différents métaux divalents affecte la capacité du chélateur à induire le gène nous indique que l'induction par le DP est bel et bien médiée par la chélation d'ions divalents qui agissent en tant que co-facteurs de répresseurs métallo-dépendants. Deuxièmement, les résultats de ces expériences nous ont permis de faire ressortir d'autres différences de régulation entre la souche originelle (*fur*⁺) et la souche *fur*⁻. On remarque que l'efficacité de l'incubation avec le Fe²⁺ et le Co²⁺ à annuler l'effet du DP sur l'expression du gène est réduite dans le mutant *fur*. Par contre, on ne remarque aucune différence entre les souches *fur*⁺ et *fur*⁻ pour ce qui est de l'efficacité du Mn²⁺ à annuler l'effet du DP. Ces résultats indiquent que le Fe²⁺ et le Co²⁺ sont des co-facteurs de Fur mais que le Mn²⁺ agit plutôt en tant que co-facteur d'un autre répresseur participant à la régulation de *mntH*.

Les résultats des expériences de régulation en milieu minimal nous ont permis d'approfondir notre compréhension de la régulation du gène *mntH* par les métaux. Comme il a été mentionné précédemment, le milieu minimal est défini chimiquement, ce qui nous a permis d'évaluer la contribution de chaque ion à la régulation du gène. Les expériences de régulation par le fer révèlent que le gène *mntH* est régulé principalement en réponse à la concentration de ce métal dans le milieu. On remarque encore une différence de régulation par le fer entre les souches *fur*⁺ et *fur*⁻ aux concentrations intermédiaires de Fe²⁺. Par contre, la régulation du gène est identique dans les deux souches en conditions de privation en fer. Ces résultats indiquent encore que la protéine Fur joue un rôle dans la régulation de *mntH* par le fer, mais qu'il n'est pas le seul facteur Fe²⁺-dépendant capable de réprimer ce gène. Dans le cas de la répression de *mntH* par le

Co²⁺, les résultats des expériences en milieu minimum indiquent clairement que la régulation par cet ion est entièrement médiée par Fur. En effet, la répression en présence de Co²⁺ est complètement abolie dans un mutant *fur*. Finalement, on remarque que la mutation *fur* n'influence pas du tout la répression de *mntH* par le Mn²⁺. Ceci confirme l'existence d'un régulateur Mn-dépendant impliqué dans la régulation de *mntH*. Puisque le gène *mntH* de *B. subtilis* est régulé par le facteur Mn-dépendant MntR, et qu'un homologue de MntR existe chez *E. coli*, nous croyons que cet homologue est responsable de la régulation Mn-dépendante du gène *mntH* de *E. coli*.

Des études portant sur la régulation des gènes *mntH* de *E. coli* et de *S. typhimurium* ont été publiées par d'autres groupes peu de temps après la complétion de nos études sur la régulation de *mntH* par les métaux. Les expériences réalisées par Patzer et Hantke (2001) sur la régulation du gène *mntH* de *E. coli* ont permis de démontrer que MntR est bien le facteur Mn-dépendant qui participe à la régulation du gène et que la répression de *mntH* par le manganèse est complètement éliminée dans un mutant *mntR*. La liaison du facteur MntR au promoteur de *mntH* a aussi été vérifiée. Les résultats obtenus par ce groupe ont aussi permis de démontrer l'implication de Fur dans la régulation de *mntH*. Par contre, leurs résultats semblent indiquer que Fur est le seul facteur responsable de la régulation par le fer du gène *mntH*. En effet, dans les conditions testées par ce groupe, la répression de *mntH* par le fer est complètement éliminée dans un mutant *fur*. Dans nos propres expériences, nous avons observé que la régulation par le fer persiste dans un mutant *fur*, puisque l'activité de la fusion *PmntH-luc* est aussi élevée dans les souches *fur*⁺ et *fur*⁻ en conditions de privation en fer.

Les différences entre nos résultats et ceux rapportés par l'autre groupe peuvent certainement être expliqués par des différences dans les conditions d'expérimentation. En effet, dans l'étude de Patzer et Hantke, les mesures d'activité de la fusion transcriptionnelle *mntH-lacZ* ont été effectuées après seulement 6 heures de croissance en milieu minimum limité en fer, tandis que nos mesures ont été effectuées après une période de 24 heures suivie d'une période de 16 heures de croissance en milieu minimum. Dans leurs conditions, on observe que l'activité de la fusion transcriptionnelle est

seulement environ 5 fois plus élevée en conditions de privation en fer que lorsque le milieu contient 10 à 20 μM de Fe^{2+} . Dans nos conditions, l'expression en présence de 100 nM de Fe^{2+} est environ 40 fois plus élevée qu'en présence de 10 μM de Fe^{2+} . Il est aussi intéressant de noter que le niveau de base d'expression de la fusion *PmntH-luc* de notre mutant *fur* en milieu riche en fer est environ 3 à 4 fois plus élevé que celui de la souche *fur*⁺. Ceci permet donc de supposer que dans les conditions testées par Patzer et Hantke, bien que le milieu de culture soit pauvre en fer, la quantité de fer qui persiste dans le milieu intra-cellulaire est probablement suffisante pour maintenir une répression partielle du gène. Il est fort probable que lors des 6 heures de croissance en milieu minimal, les cellules n'ont pas eu le temps d'atteindre la phase exponentielle de croissance et donc le manque de fer ne s'est pas fait ressentir. Une culture plus longue aurait probablement permis une meilleure dé-répression du gène *mntH* et dans ce cas, l'équipe de Patzer et Hantke auraient peut-être observé comme nous que la régulation par le fer persiste dans un mutant *fur*, bien que celle-ci soit altérée.

Les résultats de l'équipe de Kehres *et al.* (2002) sur la régulation par les métaux du gène *mntH* de *S. typhimurium* sont plus en accord avec nos propres résultats que ceux de Patzer et Hantke. Par exemple, les résultats de ce groupe démontrent aussi que la régulation de *mntH* par le fer persiste dans un mutant *fur*. Les auteurs expliquent les différences de régulation de *mntH* par le fer dans *E. coli* et dans *S. typhimurium* par le fait que les études de Patzer et Hantke aient été réalisées à l'aide d'une fusion-transcriptionnelle intra-chromosomique en l'absence d'un gène *mntH* fonctionnel, tandis que leurs propres études ont été réalisées avec une fusion sur plasmide en présence du gène *mntH* endogène. Par contre, nos propres études ont été réalisées avec une fusion transcriptionnelle intra-chromosomique en absence d'un gène *mntH* fonctionnel et nos résultats sont en accord avec ceux de Kehres et ses collaborateurs. Les différences ne sont donc pas attribuables à l'absence d'un gène endogène, mais bien à des différences dans les conditions de culture. Il est intéressant de noter que le groupe de Kehres ont effectué comme nous leurs mesures d'activité après une incubation de 16 heures en milieu minimal. L'équipe de Kehres *et al.* a aussi démontré que la régulation par le manganèse est abolie en absence de MntR, ou encore lorsque le site de liaison de MntR au promoteur

est muté. Finalement, ce groupe a démontré que la régulation par les métaux est complètement éliminée en absence de Fur et MntR. Les auteurs de cette étude déduisent donc que le fer peut aussi agir en tant que co-facteur de MntR, ce qui explique pourquoi la répression par le fer du gène *mntH* de *S. typhimurium* persiste même en absence de *fur*. Il serait donc intéressant de vérifier si la combinaison d'une mutation *mntR* avec la mutation *fur* permettrait aussi d'éliminer complètement la répression résiduelle par le fer que nous avons observée dans *E. coli*.

Nous avons examiné l'effet à long terme de l'absence de manganèse dans le milieu de culture sur l'expression de *mntH*. À la lumière des résultats publiés par Kehres et al. (2002), il n'est pas surprenant que nous n'ayons pas observé d'effet du manganèse sur la régulation du gène puisque notre milieu de culture était riche en fer et que le gène *mntH* est réprimé par Fur. Il peut tout de même sembler curieux qu'un transporteur de manganèse soit régulé principalement par le fer et ne soit pratiquement pas affecté par l'absence de Mn dans le milieu. Ceci est d'autant plus étonnant lorsque l'on considère que le gène *mntH* de la bactérie Gram-positif *B. subtilis* semble être régulé principalement par le manganèse (Que et Helmann, 2000). De plus, les expériences de liaison de MntR au promoteur de *mntH* démontrent que, bien que la protéine MntR de *B. subtilis* soit active en présence de plusieurs cations divalents *in vitro*, celle-ci n'est pas activée par le fer. Les différences physiologiques entre *E. coli* et *B. subtilis* permettent peut-être d'expliquer en partie les différences majeures de régulation du même gène dans les deux espèces. En effet, le manganèse occupe une place beaucoup plus importante dans la physiologie de *B. subtilis*, puisqu'il est essentiel au processus de sporulation. De plus, l'inactivation de la seule SOD de *B. subtilis*, une Mn-SOD, entraîne un défaut de croissance (Inaoka *et al.*, 1999). Finalement, on observe dans cette espèce qu'un mutant *mntH* requiert l'addition de manganèse pour la croissance en milieu minimum (Que et Helmann, 2000). Ceci n'est pas le cas pour *E. coli* puisque le mutant *mntH* pousse aussi bien que la souche originelle en milieu minimal. Les études démontrent que *E. coli* accumule de très faibles quantités de manganèse (Jakubovics et Jenkinson, 2001). Il est donc possible que les faibles besoins en manganèse de la bactérie *E. coli* font que celle-ci ne requiert pas un système aussi bien contrôlé que *B. subtilis* pour la régulation du

transport de manganèse. L'implication de la régulation par le fer et par Fur d'un transporteur de manganèse sera discutée de manière plus approfondie à la fin de ce chapitre.

Nous avons démontré que le gène *mntH* de *E. coli* est induit en présence de peroxyde d'hydrogène, tout comme celui de *S. typhimurium*. Dans notre système, l'induction par les chélateurs de métaux est beaucoup plus importante que l'induction par le H₂O₂. Les résultats préliminaires de Kehres *et al.* (2000) sur la régulation du gène *mntH* de *S. typhimurium* avaient démontré l'effet contraire. Il est important de noter que lors de ces études, les auteurs avaient utilisé l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) comme chélateur et que celui-ci est imperméable à la membrane (Azuma *et al.*, 2001). Les résultats de notre étude permettent de supposer que l'utilisation d'un chélateur perméable aurait probablement permis de démontrer que, tout comme dans *E. coli*, la régulation par les métaux du gène *mntH* de *S. typhimurium* est plus importante que la régulation par le peroxyde d'hydrogène.

Nous avons tenté de démontrer l'implication de OxyR, l'activateur de la réponse au stress causé par le peroxyde d'hydrogène, dans la régulation du gène *mntH* de *E. coli*. Toutefois, la transduction d'une mutation *oxyR* dans la souche PmntH n'a pas entraîné l'élimination complète de l'activation de la fusion PmntH-*luc* par le H₂O₂. Les résultats de l'étude récente de Kehres *et al.* (2002) sur la régulation de *mntH* dans *S. typhimurium* démontrent que l'induction du gène par le peroxyde d'hydrogène est éliminée en absence de OxyR ou lorsque le site prédit pour la liaison de ce facteur est muté. Il est possible que le gène *mntH* soit régulé par OxyR dans *S. typhimurium* et non dans *E. coli*. En tant que pathogène intra-cellulaire, *S. typhimurium* est exposée aux radicaux oxygénés produits par les macrophages. Ceci pourrait faire en sorte que la régulation par le H₂O₂ est plus importante chez *S. typhimurium* que chez *E. coli*. Cette hypothèse est toutefois peu probable puisque les alignements de séquences des promoteurs de *E. coli* et *S. typhimurium* démontrent que ceux-ci sont très bien conservés, autant dans la région du site de liaison à Fur que dans la région prédite du site OxyR (Kehres *et al.*, 2002). Lors de la transduction de la mutation *oxyR* dans la souche PmntH, nous avons remarqué, que la

souche receveuse restait toujours contaminée par le phage après la transduction. Ce phénomène n'avait jamais été observé auparavant lors des transductions des autres mutations que nous avons effectuées au laboratoire, mais il s'est produit à chaque essai de transduction de la mutation *oxyR*, et ceci indépendamment du lysat ou de la souche receveuse utilisée (EMG2 ou MG1655). Il est possible que la contamination par les phages des souches PmntH *oxyR* ait rendu la mutation instable, ce qui pourrait expliquer le fait que la régulation par le H₂O₂ persiste dans nos souches. La création d'un mutant *oxyR* par échange d'allèles nous permettrait de vérifier de manière plus fiable la contribution de OxyR à la régulation de *mntH*.

Nous avons démontré que le répresseur Fur se fixe réellement aux séquences en amont du gène *mntH* à l'aide d'expériences de retard sur gel. Patzer et Hantke (2001) ont toutefois été les premiers à démontrer cette liaison *in vivo* à l'aide du "Fur titration assay" (FURTA). L'introduction sur plasmide à copies multiples du site prédit de liaison de Fur au promoteur de *mntH* a entraîné la dé-répression d'une fusion chromosomique *fhuF'-lacZ* qui est aussi régulée par Fur. Cette équipe a même identifié un oligonucléotide double-brin de 22 paires de bases qui est à lui seul suffisant pour permettre la répression du gène *mntH* par la protéine Fur. Cependant, les auteurs de cette étude se sont servi d'une méthode indirecte et nous avons pu, à l'aide de nos collaborateurs, confirmer leurs résultats en démontrant pour la première fois la liaison de la protéine Fur purifiée au promoteur de *mntH* selon une approche directe *in vitro*. L'expérience où nous avons comparé l'affinité de Fur pour le promoteur de *mntH* par rapport à son affinité pour le promoteur de l'opéron *iuc* révèle la présence de bandes de hauteur intermédiaire aux concentrations intermédiaires de Fur, et ceci pour les deux promoteurs. Ces bandes avaient été observées par l'équipe qui avait étudié en premier la liaison de Fur au promoteur de *iuc* (de Lorenzo et al., 1988). Le promoteur *iuc* possède deux sites de liaison à Fur: un site primaire et un site secondaire pour lequel l'affinité de Fur est moins élevée (de Lorenzo et al., 1987). Les auteurs de ces études avaient interprété les bandes intermédiaires de retard sur gel comme étant la liaison de Fur au site primaire seulement, tandis que la bande dont la migration est la plus lente représenterait la liaison de Fur aux deux sites à la fois. La présence de bandes intermédiaires pour la liaison de Fur au promoteur de *mntH* laisse

supposer que celui-ci comprend aussi plus d'un opérateur Fur. La technique de l'empreinte à la DNase I permettrait d'identifier précisément les régions d'interaction entre Fur et le promoteur de *mntH* et de déterminer si ce promoteur comprend plus d'un opérateur Fur.

Les expériences de régulation que nous avons effectuées en milieu minimum nous ont permis d'identifier un défaut de croissance relié à la combinaison des mutations *mntH* et *fur*. Tel que mentionné dans la section des résultats, nous croyons que ce défaut de croissance est dû à un stress oxydatif entraîné à la fois par le transport constitutif de fer (mutation *fur*) et le manque de manganèse pour la détoxification des radicaux oxygénés (mutation *mntH*). Cette hypothèse est appuyée par le fait que le défaut de croissance est corrigé en ajoutant du manganèse au milieu ainsi que par la démonstration qu'un triple mutant *mntH/fur/sodB* présente un défaut de croissance encore plus prononcé. La croissance normale est aussi rétablie par la sur-expression du gène *mntH* à partir de plasmides. Ceci peut sembler curieux puisque nous n'ajoutons pas de manganèse au milieu de culture. Par contre, l'expression du gène *mntH* permet probablement à la souche *PmntHfur* d'accumuler suffisamment de Mn lors de la pré-culture en milieu riche pour permettre aux cellules de survivre et de se diviser normalement pendant les 24 heures de croissance en milieu minimal.

Les tests de diffusion sur milieu solide nous ont permis de démontrer que l'absence du gène *mntH* rend *E. coli* plus sensible au stress causé par le peroxyde d'hydrogène et le paraquat. Pour ce qui est de la sensibilité au peroxyde d'hydrogène, nous avons démontré que l'ajout de hautes concentrations de manganèse dans le milieu permet de réduire le diamètre de la zone d'inhibition du mutant *mntH* à la même taille que celui de la souche originelle. Ceci indique donc que la sensibilité au stress oxydatif du mutant *mntH* est bien causée par un manque de manganèse. Ces résultats sont appuyés par le fait que dans la bactérie *S. typhimurium*, qui possède deux transporteurs de manganèse, il est nécessaire d'inactiver à la fois les gènes *mntH* et l'opéron *sitABCD* avant d'observer une sensibilité au peroxyde d'hydrogène (Boyer *et al.*, 2002). Il a été surprenant de constater que dans les tests de diffusion sur milieu solide, la mutation *sodB*

ne fait pas augmenter la sensibilité au stress oxydatif du double mutant *PmntHfur*, même si cette mutation avait pour effet d'accentuer le défaut de croissance de la souche *PmntHfur* en milieu minimum. Le fait que les tests de diffusion sur milieu solide aient été réalisés en milieu riche pourrait expliquer ces observations. Il a d'ailleurs déjà été démontré que, bien que la croissance d'un double mutant *sodA/sodB* soit plus lente en milieu riche, c'est plutôt en milieu minimal que les phénotypes causés par l'absence des deux SOD cytoplasmiques se manifestent (Carlioz et Touati, 1986).

Le phénomène le plus difficile à expliquer parmi les résultats obtenus dans le cadre de ce projet est certainement le fait que le gène codant pour le seul transporteur de manganèse dans *E. coli* soit régulé en grande partie par le fer. En effet, c'est la privation en fer qui entraîne la dé-répression maximale enregistrée pour la fusion *PmntH-luc* en milieu minimum. L'absence de manganèse n'entraîne pas la dé-répression du gène et le facteur MntR de *E. coli* semble pouvoir être activé par le fer. Alors comment peut-on expliquer la régulation par le fer d'un transporteur de manganèse? Comme il a déjà été mentionné, la bactérie *E. coli* ne dépend pas directement du manganèse pour la croissance. Il est donc probable que son besoin principal en manganèse soit associé à la détoxification des radicaux oxygénés par la Mn-SOD. Le répresseur Fur contrôle la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer, ce qui signifie qu'en conditions de privation en fer, ces gènes sont dé-réprimés. On sait que l'entrée massive de fer entraîne un stress oxydatif dans la cellule parce que ce métal est impliqué dans la réaction de Fenton. Le fait de coupler le transport de fer avec le transport de manganèse par l'entremise du répresseur Fur pourrait donc aider à garantir une quantité suffisante de Mn-SOD fonctionnelle pour protéger la cellule contre le stress causé par un surplus en fer. Puisque Fur est impliqué dans la régulation du gène *sodA*, dont le produit est la Mn-SOD (Compan et Touati, 1993), il n'est pas surprenant que le transport du co-facteur métallique soit aussi sous le contrôle du même répresseur.

6. CONCLUSION

Les expériences effectuées dans le cadre de ce projet de maîtrise ont permis de démontrer que le gène *mntH*, dont le produit est le seul transporteur de manganèse de *E. coli*, est régulé par le fer et par le répresseur Fur. Les résultats présentés suggèrent aussi l'implication d'un répresseur Mn-dépendant dans la régulation du gène *mntH*. La participation de ce gène à la réponse au stress oxydatif a aussi été démontrée. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés par d'autres groupes ayant étudié la régulation des gènes *mntH* chez les entérobactéries.

Les résultats présentés dans cet ouvrage, combinés à ceux obtenus par d'autres groupes, ont permis de répondre en partie à l'objectif principal de la recherche, qui visait à mieux comprendre le rôle des transporteurs de manganèse dans la physiologie des bactéries. L'importance du manganèse dans la réponse au stress oxydatif avait déjà été soulignée auparavant. Toutefois, la constatation que la bactérie *E. coli* réussit à combiner le transport de manganèse au transport de fer pour assurer une protection accrue contre le stress oxydatif nous permet d'apprécier la complexité des systèmes de régulation des gènes bactériens.

Tel que mentionné dans l'introduction de ce mémoire, l'étude du transport de manganèse est un sujet qui commence à peine à être exploré. Les quelques études ayant porté sur la régulation du gène *mntH* dans les entérobactéries nous ont permis de mieux comprendre l'influence des métaux dans la régulation de ce gène, toutefois, il reste encore plusieurs choses à découvrir. Par exemple, il serait particulièrement intéressant d'effectuer une étude approfondie de l'expression du gène *mntH* de *S. typhimurium* ou d'autres pathogènes intra-cellulaires lors de l'infection. Ces études permettraient peut-être d'associer le transport de manganèse avec la virulence. La recherche d'autres conditions environnementales qui influencent l'expression du gène *mntH*, ainsi que celle des autres gènes codant pour des transporteurs de manganèse, doit aussi se poursuivre si on veut espérer comprendre un jour le rôle du manganèse dans la physiologie des bactéries. L'étude des protéines MntH des groupes B et C nous permettra certainement de mieux comprendre la conservation de cette famille de transporteurs lors de l'évolution. Certaines de ces études sont déjà en cours dans le laboratoire du Dr. Cellier, sans mentionner celles

effectuées par d'autres équipes de recherche sur les autres types de transporteurs de manganèse retrouvés chez les bactéries. Nous pouvons donc espérer que dans quelques années, le transport de manganèse dans les bactéries soit aussi bien documenté que l'acquisition du fer.

7. BIBLIOGRAPHIE

AGRANOFF, D. D., ET KRISHNA, S. 1998. Metal ion homeostasis and intracellular parasitism. *Mol. Microbiol.* **28**: 403-412.

ARCHIBALD, F. 1986. Manganese : its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **13** :63-109.

ARSLAN, P., DI VIRGILIO, F., BELTRAME, M., TSIEN, R. Y., ET POZZAN, T. 1985. Cytosolin Ca²⁺ homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas: A new membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **260**: 2719

ASLUND, F. ZHENG, M., BECKWITH, J., ET STORZ, G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. 1999. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 6161-6165.

AZUMA, T., IKEDA, S., KONDO, T., IMAI, H., ET YAMADA, M. 2001. Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid induces parthenogenetic activation of porcine oocytes at the germinal vesicle stage, leading to formation of blastocysts. *Biol. Reprod.* **64**: 647-653.

BAGG, A., ET NEILANDS, J. B. 1985. Mapping of a mutation affecting regulation of iron uptake systems in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **161**: 450-453.

BARTSEVICH. V. V., ET PAKRASI, H. B. 1995. Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese : analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *EMBO J.* **14** :1845-1853.

BARTSEVICH. V. V., ET PAKRASI, H. B. 1996. Manganese transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **271** :26057-26061.

BEARDEN, S. W., STAGGS, T. M., ET PERRY, R. D. 1998. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J. Bacteriol.* **180** :1135-1147.

BEARDEN, S. W., ET PERRY, R. D. 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol. Microbiol.* **32** :403-414.

BENOV, L. 2001. How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* **217**: 33-36.

BERLYN, M. B., ET LETOVSKY, S. 1992. Genome-related datasets within the *E. coli* Genetic Stock Center database. *Nucleic Acids Res.* **20** : 6143-6151.

BIRNBOIM, H. C., ET DOLY, J. 1979. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7** : 1513-1522.

- BLATTNER, F. R., PLUNKETT, G. III, BLOCH, C. A., PERNA, N. T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J. D., RODE, C. K., MAYHEW, G. F., GREGOR, J., DAVIS, N. W., KIRKPATRICK, H. A., GOEDEN, M. A., ROSE, D. J., MAU, B., ET SHAO, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277** : 1453-1474.
- BOYD, J., OZA, M. N., ET MURPHY, J. R. 1990. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria tox iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 5968-5972.
- BOYER E., BERGEVIN, I., MALO, D., GROS, P., ET CELLIER, M. F. 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.* **70**: 6032-6042.
- BULLEN, J. J. 1981. The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 1127-1138.
- BUSCHMAN, E., ET SKAMENE, E. 2001. From Bcg/Lsh/Ity to Nramp1: Three decades of search and research. *Drug Metab. Dispos.* **29**: 471-473.
- CABISCOL, E., TAMARIT, J., ET ROS, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* **3**: 3-8.
- CALDERWOOD, S. B., ET MEKALANOS, J. J. 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J. Bacteriol.* **169**: 4759-4764.
- CALDERWOOD, S. B., ET MEKALANOS, J. J. 1988. Confirmation of the Fur operator site by insertion of a synthetic oligonucleotide into an operon fusion plasmid. *J. Bacteriol.* **170**: 1015-1017.
- CANONNE-HERGAUX, F., GRUENHEID, S., PONKA, P., ET 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.
- CARLIOZ, A., ET TOUATI, D. 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* **5**: 623-630.
- CARNIEL, E. 1999. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *Int. Microbiol.* **2** :161-167.
- CARSON, S. D., KLEBBA, P. E., NEWTON, S. M., ET SPARLING, P. F. 1999. Ferric enterobactin binding and utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **181**: 2895-2901.
- CELLIER, M., GOVONI, G., VIDAL, S., KWAN, T., GROULX, N., LIU, J., SANCHEZ, F., SKAMENE, E., SCHURR, E., ET 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.

- CELLIER, M., PRIVÉ, G., BELOUCHI, A., KWAN, T., RODRIGUES, V., CHIA, W., ET GROS, P. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 10089-10093.
- CELLIER, M. 2001. "Bacterial Genes Controlling Manganese Accumulation" in *Microbial Transport Systems* (Edited by G. Winkelmann). Wiley-VCH. p. 325-345.
- CELLIER, M. F. M., BERGEVIN, I., BOYER, E., ET RICHER, E. 2001. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Genet.* **17** : 365-370.
- CHANDER, M. SETLOW, B., ET SETLOW, P. 1998. The enzymatic activity of phosphoglycerate mutase from gram-positive endospore-forming bacteria requires Mn^{2+} and is pH sensitive. *Can. J. Microbiol.* **44**: 759-767.
- CHANG, C., MOOSER, A., PLÜCKTHUN, A., ET WLODAWER, A. 2001. Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.* **276**: 27535-27540.
- CHRISTMAN, M. F., STORZ, G., ET AMES, B. N. 1989. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 3484-3488.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L., ET MILLER, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2172-2175.
- COMPAN, I., ET TOUATI, D. 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175** :1687-1696.
- CROSA, J. H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**: 517-530.
- DE LORENZO, V., GIOVANNINI, F., HERRERO, M., ET NEILANDS, J.B. 1988. Metal ion regulation of gene expression : Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. *J. Mol. Biol.* **203** :875-884.
- DE LORENZO, V., WEE, S., HERRERO, M., ET NEILANDS, J. B. 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid pColV-K30 binding the ferric uptake regulation (Fur) repressor. *J. Bacteriol.* **169**: 2624-2630.
- DING, H., ET DEMPLE, B. 2000. Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 5146-5150.

- D'SOUZA, J., CHEAH, P. Y., GROS, P., CHIA, W., AND RODRIGUES, V. 1999. Functional complementation of the *malvolio* mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1). *J. Exp. Biol.* **202**: 1909-1915.
- DUBRAC, S. ET TOUATI, D. 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J. Bacteriol.* **182**: 3802-3808.
- DUBRAC, S., ET TOUATI, D. 2002. Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology.* **148** :147-156.
- ERNST, J. F., BENNETT, R. L., ET ROTHFIELD, L. I. 1978. Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **135**: 928-934.
- ESCOLAR, L., PEREZ-MARTIN, J., ET DE LORENZO, V. 1998. Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J. Mol. Biol.* **283**: 537-547.
- ESCOLAR, L., PEREZ-MARTIN, J., ET DE LORENZO, V. 1999. Opening the iron box : transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* **181** : 6223-6229.
- FLEMING, M. D., TRENOR, C. C. 3RD, SU, M. A., FOERNZLER, D., BEIER, D. R., DIETRICH, W. F., ET ANDREWS, N. C. 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* **16**: 383-386.
- FLEMING, M. D., ROMANO, M. A., SU, M. A., GARRICK, L. M., GARRICK, M. D., ET ANDREWS, N. C. 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**: 1148-1153.
- FORBES, J. R., ET GROS, P. 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **9** : 397-403.
- FRECHON, D., ET LE CAM, E. 1994. Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 346-355.
- GAUDU, P., ET WEISS, B. 1996. SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 10094-10098.
- GAUDU, P., MOON, N., ET WEISS, B. 1997. Regulation of the *soxRS* stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**: 5082-5086.

- GONZALEZ DE PEREDO, A., SAINT-PIERRE, C., LATOUR, J. M., MICHAUD-SORET, I., ET FOREST, E. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J. Mol. Biol.* **310**: 83-91.
- GOVONI, G., GAUTHIER, S., BILLIA, F., ISCOVE, N. N., ET GROS, P. 1997. Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages in vitro and in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **62**: 277-286.
- GRAY-OWEN, S. D., ET SCHRYVERS, A. B. 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4**: 185-191.
- GRIGGS, D. W., ET KONISKY, J. 1989. Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli cir* gene: metal-dependent binding of Fur protein to the promoters. *J. Bacteriol.* **171**: 1048-1052.
- GRUENHEID, S., CELLIER, M., VIDAL, S., ET GROS, P. 1995. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics.* **25**: 514-525.
- GRUENHEID, S., PINNER, E., DESJARDINS, M., ET 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.
- GRUENHEID, S., CANONNE-HERGAUX, F., GAUTHIER, S., HACKAM, D. J., GRINSTEIN, S., ET GROS, P. 1999. The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* **189**: 831-841.
- GRUENHEID, S., ET GROS, P. 2000. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 43-48.
- GUNSHIN, H., MACKENZIE, B., BERGER, U. V., GUNSHIN, Y., ROMERO, M. F., BORON, W. F., NUSSBERGER, S., GOLLAN, J. L., ET HEDIGER, M. A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* **388**: 482-488.
- HANTKE, K. 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol. Gen. Genet.* **182** :288-292.
- HANTKE, K. 1984. Cloning of the repressor protein gene of iron-regulated systems in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 337-341.
- HANTKE, K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **4** :172-177.

- HAO, Z., CHEN, S., ET WILSON, D. B. 1999. Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65** :4746-4752.
- HAYASHI, T., MAKINO, K., OHNISHI, M., KUROKAWA, K., ISHII, K., YOKOYAMA, K., HAN, C.-G., OHTSUBO, E., NAKAYAMA, K., MURATA, T., TANAKA, M., TOBE, T., IIDA, T., TAKAMI, H., HONDA, T., SASAKAWA, C., OGASAWARA, N., YASUNAGA, T., KUHARA, S., SHIBA, T., HATTORI, M. ET SHINAGAWA, H. 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* **8**: 11-22.
- HELD, K. G., ET POSTLE, K. 2002. ExbB and ExbD do not function independently in TonB-dependent energy transduction. *J. Bacteriol.* **184**: 5170-5173.
- HENNECKE, H. 1990. Regulation of bacterial gene expression by metal-protein complexes. *Mol. Microbiol.* **4**: 1621-1628.
- HIDALGO, E., BOLLINGER, J. M. JR., BRADLEY, T. M., WALSH, C. T., ET DEMPSEY, B. 1995. Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *J. Biol. Chem.* **270**: 20908-20914.
- IMBERT, M., ET BLONDEAU, R. 1998. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* **37** :64-66.
- IMLAY, K. R., ET IMLAY, J. A. 1996. Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 2564-2571.
- INAOKA, T., MATSUMURA, Y., ET TSUCHIDO, T. 1999. SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 1939-1943.
- JAIR, K. W., MARTIN, R. G., ROSNER, J. L., FUJITA, N., ISHIHAMA, A., ET WOLF, R. E. JR. 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. *J. Bacteriol.* **177**: 7100-7104.
- JAIR, K. W., YU, X., SKARSTAD, K., THONY, B., FUJITA, N., ISHIHAMA, A., ET WOLF, R. E. JR. 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J. Bacteriol.* **178**: 2507-2513.
- JABADO, N., JANKOWSKI, A., DOUGAPARSAD, S., PICARD, V., GRINSTEIN, S., ET 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.

- JAKUBOVICS, N. S., SMITH, A. W., ET JENKINSON, H. F. 2000. Expression of the virulence-related Sca (Mn^{2+}) permease in *Streptococcus gordonii* is regulated by a diphtheria toxin metalloregressor-like protein ScaR. *Mol. Microbiol.* **38** :140-153.
- JAKUBOVICS, N. S., ET JENKINSON, H. F. 2001. Out of the iron age : new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology.* **147** :1709-1718.
- KAMMLER, M., SCHÖN, C., ET HANTKE, K. 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175** :6212-6219.
- KATOH, H., HAGINO, N., GROSSMAN, A. R., ET OGAWA, T. 2001. Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **183**: 2779-2784.
- KEHRES, D. G., JANAKIRAMAN, A., SLAUCH, J. M., ET MAGUIRE, M. E. 2002. Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *mntH* transcription by H_2O_2 , Fe^{2+} , and Mn^{2+} . *J. Bacteriol.* **184**: 3151-3158.
- KEHRES, D. G., ZAHARIK, M. L., FINLAY, B. B., ET MAGUIRE, M. E. 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* **36** :1085-1100.
- KENNEY, C. D., ET CORNELISSEN, C. N. 2002. Demonstration and characterization of a specific interaction between gonococcal transferrin binding protein A and TonB. *J. Bacteriol.* **184**: 6138-6145.
- KUHN, D. E., BAKER, B. D., LAFUSE, W. P., ET ZWILLING, B. S. 1999. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with Nramp1Gly169 or Nramp1Asp169. *J. Leukoc. Biol.* **66**: 113-119.
- KULLIK, I., TOLEDANO, M. B., TARTAGLIA, L. A., ET STORZ, G. 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **177**: 1275-1284.
- LE CAM, E., FRECHON, D., BARRAY, M., FOURCADE, A., ET DELAIN, E. 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 11816-11820.
- LIN, J. J., SMITH, M., JESSEE, J., ET BLOOM, F. 1992. DH11S: an *Escherichia coli* strain for preparation single-stranded DNA from phagemid vectors. *Biotechniques* **12**: 718-721.
- LINK, A. J., PHILLIPS, D., ET CHURCH, G. M. 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *E. coli* : application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179** :6228-6237.
- LOEWEN, P. C., ET SWITALA, J. 1986. Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell. Biol.* **64**: 638-646.

LURDES, M., FERNANDEZ, T., SANTOS, M., ROCHA, R., FLORÊNCIO, M. H., ET JENNINGS, K. R. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.* **36**: 1199-1208.

MACMICKING, J., XIE, Q. W., ET NATHAN, C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 323-350.

MAKUI, H., ROIG, E., COLE, S. T., HELMANN, J. D., GROS, P., ET CELLIER, M. F. M. 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* **35** :1065-1078.

MALO, D., VOGAN, K., VIDAL, S., HU, J., CELLIER, M., SCHURR, E., FUKS, A., BUMSTEAD, N., MORGAN, K., ET GROS, P. 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics.* **23**: 51-61.

MANEN, D., POUGEON, M., DAMAY, P., ET GEISELMANN, J. 1997. A sensitive reporter gene system using bacterial luciferase based on a series of plasmid cloning vectors compatible with derivatives of pBR322. *Gene.* **186**:197-200.

MASSÉ, E., ET GOTTESMAN, S. 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4620-4625.

MERCKAMM, M., ET GUYONVARCH, A. 2001. Cloning of the *sodA* gene from *Corynebacterium melassecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability. *J. Bacteriol.* **183**: 1284-1295.

MICHAUD-SORET, I., ADRAIT, A., JAQUINOD, M., FOREST, E., TOUATI, D., ET LATOUR, J.-M. 1997. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of the apo- and metal-substituted forms of the Fur protein. *FEBS Lett.* **413** :473-476.

MILLER, J. H. 1992. *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

MILTON, J. S. 1992. *Statistical Methods in the Biological and Health Sciences*, 2nd Edition. McGraw-Hill, Inc. 526 pages.

MOECK, G. S., ET COULTON, J. W. 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**: 675-681.

NEIDHARDT, F. C., BLOCH, P. L., ET SMITH, D. F. 1994. Culture medium for Enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**: 736-747.

NELSON, N. 1999. Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J.* **18** :4361-4371.

- NIVEN, D. F., EKINS, A., ET AL-SAMAURAI, A. A. 1999. Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Can. J. Microbiol.* **45** :1027-1032.
- NORDEEN, S. K. 1988. Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques.* **6**: 454-457.
- NOVAK, R., BRAUN, J. S., CHARPENTIER, E., ET TUOMANEN, E. 1998. Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae* : the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol. Microbiol.* **29** :1285-1296.
- NUNOSHIBA, T., HIDALGO, E., AMABILE CUEVAS, C. F., ET DEMPLE, B. 1992. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J. Bacteriol.* **174**: 6054-6060.
- NUNOSHIBA, T., DEROJAS-WALKER, T., TANNENBAUM, S. R., ET DEMPLE, B. 1995. Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect. Immun.* **63**: 794-798.
- ORGAD, S., NELSON, H., SEGAL, D., ET NELSON, N. 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J. Exp. Biol.* **201**: 115-120.
- PARK, S. J., ET GUNSALUS, R. P. 1995. Oxygen, iron, carbon, and superoxide control of the fumarase *fumA* and *fumC* genes of *Escherichia coli*: role of the *arcA*, *fnr*, and *soxR* gene products. *J. Bacteriol.* **177**: 6255-6262.
- PATZER, S., ET HANTKE, K. 2001. Dual repression by Fe²⁺-Fur and Mn²⁺-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn²⁺ transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183** : 4806-4813.
- PETRAT, F., DE GROOT, H., ET RAUEN, U. 2001. Subcellular distribution of chelatable iron: a laser scanning microscopic study in isolated hepatocytes and liver endothelial cells. *Biochem. J.* **356**: 61-69.
- PINNER, E., GRUENHEID, S., RAYMOND, M., ET GROS, P. 1997. Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family SMF by NRAMP2, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J. Biol. Chem.* **272**: 28933-28938.
- POMPOSIELLO, P. J., ET DEMPLE, B. 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol.* **19**: 109-114.
- PORTNOY, M. E., LIU, X. F., ET CULOTTA, V. C. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7893-7902.

POSEY, J. E., HARDHAM, J. M., NORRIS, S. J., ET GHERARDINI, F. C. 1999. Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96** :10887-10992.

POSEY, J. E., ET GHERARDINI, F. C. 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. Science. **288** : 1651-1653.

PRESSLER, U., STAUDENMAIER, H., ZIMMERMANN, L., ET BRAUN, V. 1988. Genetics of the iron dicitrate transport system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170**: 2716-2724.

QUE, Q., ET HELMANN, J. D. 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor (DtxR) family of proteins. Mol. Microbiol. **35** :1454-1468.

ROBEY, M., ET CIANCOTTO, N. P. 2002. *Legionella pneumophila feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. Infect. Immun. **70**: 5659-5669.

RODRIGUES, V., CHEAH, P. Y., RAY, K., CHIA, W. 1995. *malvolio*, the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (Bcg), is expressed in macrophages and the the nervous system and is required for normal taste behavior. EMBO J. **14**: 3007-3020.

SAITO, T., WORMALD, M. R., ET WILLIAMS, R. J. 1991. Some structural features of the iron-uptake regulation protein. Eur. J. Biochem. **197**: 29-38.

SAKAMOTO, H., ET TOUATI, D. Cloning of the iron superoxide dismutase gene (*sodB*) in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **159**: 418-420.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., ET MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. pages 1.25-1.28 et 7.43-7.45.

SCHELLHORN, H. E., ET HASSAN, H. M. 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **170**: 4286-4292.

SCHMITT, M. P., TWIDDY, E. M., ET HOLMES, R. K. 1992. Purification and characterization of the diphtheria toxin repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**: 7576-7580.

SCHRYVERS, A. B., ET STOJILJKOVIC, I. 1999. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. Mol. Microbiol. **32**: 1117-1123.

SCHULTZ-HAUSER, G., KÖSTER, W., SCHWARZ, H., ET BRAUN, V. 1992. Iron(III) hydroxamate transport in *Escherichia coli* K-12: FhuB-mediated membrane association of the FhuC protein and negative complementation of *fhuC* mutants. J. Bacteriol. **174**: 2305-2311.

- SEGAL, A. W., ET ABO, A. 1993. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 43-47.
- SILVER, S., ET WALDERHAUG, M. 1992. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **56** :195-228.
- STORZ, G., ET IMLAY, J. A. 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 188-194.
- STORZ, G., TARTAGLIA, L. A., ET AMES, B. N. 1990. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* **248**: 189-194.
- TAO, K., MAKINO, K., YONEI, S., NATAKA, A., ET SHINAGAWA, H. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 371-376.
- TAO, X., ET MURPHY, J. R. 1994. Determination of the minimal essential nucleotide sequence for diphtheria tox repressor binding by *in vitro* affinity selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 9646-9650.
- THOMAS, C. E., MOREHOUSE, L. A., ET AUST, S. D. 1985. Ferritin and superoxide-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **260**: 3275-3280.
- THOMINE, S., WANG, R., WARD, J. M., CRAWFORD, N. M., ET SCHROEDER, J. L. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 4991-4996.
- TOLEDANO, M. B., KULLIK, I., TRINH, F., BAIRD, P. T., SCHNEIDER, T. D., ET STORZ, G. 1994. Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**: 897-909.
- TOUATI, D. 1983. Cloning and mapping of the manganese superoxide dismutase gene (*sodA*) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **155**: 1078-1087.
- TOUATI, D., JACQUES, M., TARDAT, B., BOUCHARD, L., ET DESPIED, S. 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* **177**: 2305-2314.
- TOUATI, D. 2000a. Sensing and protecting against superoxide stress in *Escherichia coli*-how many ways are there to trigger *soxRS* response? *Redox Report* **5**: 287-293.
- TOUATI, D. 2000b. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373** : 1-6.

- TREVES, S., TRENTINI, P. L., ASCANELLI, M., BUCCI, G., ET DI VIRGILIO, F. 1994. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp. Cell. Res.* **211**: 339-343.
- TSENG, H. J., MCEWAN, A. G., PATON, J. C., ET JENNINGS, M. P. 2002. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* : PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun.* **70** :1635-1639.
- TSOLIS, R. M., BÄUMLER, A. J., HEFFRON, F., ET STOJILJKOVIC, I. 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect. Immun.* **64** :4549-4556.
- VELAYUDHAN, J., HUGHES, N. J., MCCOLM, A. A., BAGSHAW, J., CLAYTON, C. L., ANDREWS, S. C., ET KELLY, D. J. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori* : a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37** :274-286.
- VIDAL, S. M., MALO, D., VOGAN, K., SKAMENE, E., ET GROS, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites : isolation of a candidate gene for *Bcg*. *Cell.* **73** :469-485.
- VIDAL, S. M., PINNER, E., LEPAGE, P., GAUTHIER, S., ET 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.
- VISWANATHAN, V. K., ET CIANCOTTO, N. P. 2001. Role of iron acquisition in *Legionella pneumophila* virulence. *ASM News.* **67**: 253-258.
- WATNICK, P. I., ETO, T., TAKAHASHI, H., ET CALDERWOOD, S. B. 1997. Purification of *Vibrio cholerae* Fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Bacteriol.* **179**: 243-247.
- WEE, S., NEILANDS, J. B., BITTNER, M. L., HEMMING, B. C., HAYMORE, B. L., ET SEETHARAM, R. 1988. Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K-12. *Biol. Met.* **1**: 62-68.
- WELCH, R. A., BURLAND, V., PLUNKETT, G. D. III, REDFORD, P., ROESCH, P., RASKO, D. A., BUCKLES, E. L., LIU, S.-R., BOUTIN, A., HACKETT, J., STROUD, D., MAYHEW, G. F., ROSE, D. J., ZHOU, S., SCHWARTZ, D. C., PERNA, N. T., MOBLEY, H. L. T., DONNENBERG, M. S. ET BLATTNER, F. R. 2002 Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 17020-17024.

WOOLDRIDGE, K. G., MORRISSEY, J. A., ET WILLIAMS, P. H. 1992. Transport of ferric-aerobactin into the periplasm and cytoplasm of *Escherichia coli* K12: role of envelope-associated proteins and effect of endogenous siderophores. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 597-603.

WOOLDRIDGE, K. G., ET WILLIAMS, P. H. 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12** :325-348.

WU, J., DUNHAM, W. R., ET WEISS, B. 1995. Overproduction and physical characterization of SoxR, a [2Fe-2S] protein that governs an oxidative response regulon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**: 10323-10327.

ZHANG, L., LEE, T., WANG, Y., ET SOONG, T. W. 2000. Heterologous expression, functional characterization and localization of two isoforms of the monkey iron transporter Nramp2. *Biochem. J.* **349**: 289-297.

ZHENG, M., ASLUND, F., ET STORZ, G. 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* **279**: 1718-1721.

