



Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier
Laval, Québec

Étude de la régulation du gène *mntH* chez les entérobactéries

Evelyn A. Castillo

©2006

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître en Sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

François Shareck

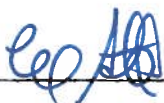
Examineur externe

Danielle Malo

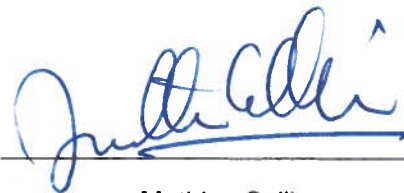
Directeur de recherche

Mathieu Cellier

Les métaux tels que le fer et le manganèse sont des éléments généralement présents en quantité limitante dans l'environnement. Les transporteurs MntH procaryotes facilitent l'acquisition de plusieurs cations divalents par ordre d'affinité décroissante, Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} . Des pathogènes très virulents comme l'uropathogène *E. coli* CFT073 possèdent plusieurs systèmes d'acquisition de fer et manganèse absents des souches non-pathogènes tel que ceux qui utilisent les sidérophores aérobactine et salmochéline ainsi que celui codé pour l'homologue de *sitABCD*, un opéron identifié chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Le but de la recherche présentée est de caractériser la régulation du gène *mntH* de *E. coli*, afin d'élucider son rôle physiologique et évaluer son implication possible dans la virulence bactérienne. Le niveau d'induction du gène *mntH* a été mesuré à l'aide d'une fusion transcriptionnelle *PmntH*-luciférase intégrée dans le chromosome de différentes souches. La métallobrégulation du gène a été étudiée, soit en traitant les cellules avec des chélateurs perméables et non-perméables à la membrane, soit en les cultivant dans du milieu minimal limité en fer ajouté. L'expression de *mntH* est fortement régulée par le fer, et son expression augmente considérablement en présence de chélateurs de fer perméables à la membrane. L'effet d'agents oxydants sur le niveau de transcription du gène a été mesuré en présence de différents peroxydes et/ou de la mutation $\Delta oxyR$ qui inactive un régulateur prépondérant à la réponse au stress oxydatif. L'expression de *mntH* augmente en présence de H_2O_2 et tBOOH dans les trois souches testées, mais à des niveaux différents. L'absence du gène *oxyR* n'affecte pas l'expression de *mntH* en présence d'agents oxydants dans les souches K-12, il est donc possible de dire que cette induction se fasse par un autre régulateur. L'effet des conditions testées sur la croissance des souches utilisées a aussi été mesuré. La combinaison des mutations $\Delta mntH$ et $\Delta oxyR$ dans les souches K-12 n'augmente pas leur susceptibilité aux oxydants. L'influence du régulateur de l'homéostasie du fer chez *E. coli*, Fur, a aussi été étudiée en réponse aux oxydants testés. La combinaison des mutations $\Delta mntH$ et Δfur résulte dans l'absence de l'induction de *mntH* en présence d'agents oxydants. Fur aurait donc un rôle à jouer dans la régulation de *mntH* par le stress oxydatif. Afin de continuer la caractérisation des transporteurs de métaux divalents et leur rôle dans la virulence chez *Salmonella* Typhimurium, le protocole du test de résistance à la gentamicine a été mis au point pour inclure la synchronisation de l'adhésion des bactéries aux macrophages, de plus la MOI optimale a été trouvée pour les souches WT et MS. Afin d'effectuer une quantification plus rapide de la répllication intracellulaire dans les cellules phagocytaires, une souche portant le gène de la GFP intégrée dans le génome a été construite.



Evelyn A. Castillo



Mathieu Cellier

En premier lieu je désire remercier mon directeur de recherche Mathieu Cellier pour m'avoir donné l'opportunité de m'incorporer dans son laboratoire afin d'effectuer mes études graduées. Je le remercie aussi de m'avoir guidée au cours de ce projet qui n'a pas toujours été facile.

Il y a trois personnes qui ont été membres du labo que je tiens à remercier de façon particulière. Un grand merci à Isabelle Bergevin qui m'a beaucoup appris au cours de mon stage d'été en 2002. Un grand merci à Roman Chaloupka pour m'avoir guidée au tout début de mes expériences avec la GFP. Enfin, merci à Étienne Richer qui a été un guide exceptionnel pour tout ce qui se rapportait aux protocoles de culture cellulaire.

Je tiens à remercier les autres membres du labo pour leur support pendant ces deux dernières années. Frédéric Veyrier et Pascal Courville qui étaient là du début à la fin, Laetitia Cortes, Louise Wilson et Carole Campion qui sont arrivées par la suite. Vous avez tous contribué à faire de cette expérience quelque chose d'inoubliable tant au plan personnel que professionnel.

Un grand merci à ma famille pour leur compréhension et patience. Mon conjoint Walter, sans qui je ne serais jamais capable de me relever lorsque je tombe. Mon fils Luis Alejandro, sans qui je n'aurais jamais eu l'inspiration de réussir ce que j'entreprends. Et surtout ma mère qui a fait tous les efforts du monde pour que j'aie la meilleure éducation possible.

Enfin j'aimerais remercier mes amis qui n'étaient pas avec moi jour après jour au labo mais qui dans leur propre façon m'ont appuyé tout le long, Piotr, Julie, Patrick, Valérie, et Étienne D.

	Page
Résumé	ii
Remerciements	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
1. Introduction	2
2. Revue de littérature	
2.1. Exemples de micronutriments métalliques	5
2.1.1. Le fer	5
2.1.2. Le manganèse	7
2.2. Transport du fer et manganèse	8
2.2.1. Nramp1 et Nramp2 des vertébrés supérieurs	8
2.2.2. MntH	10
2.2.3. SitABCD	11
2.2.4. Les sidérophores et les hémophores	12
2.2.5. FeoB	16
2.3. Régulation par le fer et le manganèse dans les bactéries	19
2.3.1. Fur et DxtR	19
2.3.2. MntR	20
2.4. Stress oxydatif	21
2.4.1. Types d'oxydants	21
2.4.2. Mécanismes de détoxification	23
3. Matériel et méthodes	
3.1. Souches bactériennes, cellules et milieux de culture	26
3.2. Produits chimiques et réactifs de biologie moléculaire	28
3.3. Protocoles généraux de biologie moléculaire	29
3.3.1. Extraction d'ADN plasmidique et d'ADN génomique	29

3.3.2. Préparation des cellules électro-compétentes et électroporation	30
3.3.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	31
3.3.4. Enzymes de digestion et de modification	31
3.3.5. Électrophorèse	31
3.3.6. Construction du plasmide permettant la complémentation de la mutation $\Delta oxyR$	33
3.3.7. Construction du plasmide permettant la complémentation de la mutation Δfur	33
3.3.8. Construction des plasmides suicides pTnsitA et pTntonB	34
3.4. Conjugaison	34
3.5. Transductions	35
3.6. Induction du gène <i>mntH</i> de <i>E. coli</i> en milieu minimum G/M MOPS	36
3.7. Induction du gène <i>mntH</i> de <i>E. coli</i> par différents chélateurs de métaux et par des agents oxydatifs	36
3.8. Tests de diffusion en milieu solide	37
3.9. Test de sensibilité à la gentamicine	37
3.10. Construction du plasmide pP _{tac} GFPmut3LVA	38
3.11. Construction du plasmide pTn4454GFPmut3LVA et pTn790GFPmut3LVA	39
3.12. Échange de la queue déstabilisante dans pTn790(et 4454) GFPmut3LVA pour AAV, ASV et LAA	40
3.13. Construction du plasmide pTnGFPmut3	40
3.14. Mesure de la fluorescence émise par <i>E. coli</i> (transformée avec les différents plasmides fluorescents) et par <i>Salmonella</i> Typhimurium (GFP insérée dans le génome)	40
4. Résultats et discussion	
4.1. Régulation de la fusion transcriptionnelle chromosomique <i>PmntH-luc</i> de <i>E. coli</i> par différents inducteurs	43
4.1.1. Les chélateurs perméables à la membrane induisent une expression beaucoup plus forte du gène <i>mntH</i> que les chélateurs non-perméables à la membrane	43

4.1.2.	La régulation de l'expression du gène <i>mntH</i> est similaire dans la souche uropathogène CFT073 et dans les souches K-12 en présence de chélateurs de fer	44
4.1.3.	La régulation de la fusion transcriptionnelle <i>PmntH-luc</i> en milieu minimum G/M MOPS est différente dans la souche uropathogène CFT073 vs. EMG2 et MG1655	50
4.1.4.	Les agents oxydants induisent d'avantage l'expression du gène <i>mntH</i> dans les souches K-12 EMG2 et MG1655 vs. CFT073	53
4.1.5.	La mutation $\Delta oxyR$ n'abolit pas l'induction de la fusion transcriptionnelle <i>PmntH-luc</i> en présence d'agents oxydants	56
4.1.6.	La mutation Δfur limite l'induction de la fusion transcriptionnelle <i>PmntH-luc</i> en présence d'agents oxydants	60
4.2.	Tests de diffusion sur milieu solide	65
4.2.1.	La mutation $\Delta oxyR$ provoque une hypersensibilité aux oxydants dans la souche EMG2, mais pas dans la souche MG1655	64
4.3.	Recherche de conditions optimales pour le test de sensibilité à la gentamicine	66
4.4.	Fluorescence des GFP produites par les plasmides $pP_{lac}GFPmut3LVA$ et $pJBA111LC$	68
4.5.	Fluorescence de la GFPASV insérée en copie unique dans le génome de <i>Salmonella</i> Typhimurium	69
5.	Conclusions	76
6.	Bibliographie	80

	Page
Figure 1. Rôle des transporteurs de métaux divalents dans l'infection	14
Figure 2. Organisation générale des systèmes d'acquisition de fer utilisant des sidérophores chez les bactéries Gram- et Gram+	18
Figure 3. Étapes dans la production des différents radicaux oxygénés	22
Figure 4. Régulation du gène <i>mntH</i> par des chélateurs de métaux divalents	46
Figure 5. Activité du promoteur du gène <i>mntH</i> lors de croissance lorsque la disponibilité de fer est restreinte. Comparaison entre une souche uropathogène et deux souches K-12.	49
Figure 6. Induction du gène <i>mntH</i> par deux agents oxydants. Comparaison entre deux souches non-pathogènes et une souche uropathogène	55
Figure 7. influence de <i>oxyR</i> sur l'induction du gène <i>mntH</i> par deux agents oxydants	59
Figure 8. Induction du gène <i>mntH</i> par deux agents oxydants dans un double mutant <i>PmntH-luc Δfur</i>	63
Figure 9. Fluorescence des clones pP _{tac} GFPmut3LVA et pJBA111LC	72
Figure 10. Intensité de fluorescence obtenue avec la fusion P _{tac} GFP insérée dans le génome de <i>Salmonella</i> Typhimurium et effet de l'expression de la fusion intra-chromosomique STM790 :: GFPASV et STM4454 :: GFPASV sur la croissance chez <i>Salmonella</i> Typhimurium	74

	Page
Tableau 1. Souches bactériennes utilisées pour l'étude	27
Tableau 2. Plasmides utilisés pour l'étude	28
Tableau 3. Amorces utilisées pour les réactions de polymérase en chaîne.	32
Tableau 4. Sensibilité de différents mutants <i>E. coli</i> K-12 $\Delta oxyR$ au peroxyde d'hydrogène et au tert-butyl hydroperoxyde	66
Tableau 5. Comparaison entre les paramètres qui influencent les résultats lors des tests de sensibilité à la gentamicine	68

λ :	longueur d'onde
BPS :	acide bathophénanthroline disulfonique disodique
BSA :	« bovine serum albumin »
BrEt :	bromure d'éthidium
<i>cat</i> :	chloramphénicol acétyl transférase
CIP :	« calf intestinal phosphatase »
Cm :	chloramphénicol
DMEM:	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO :	sulfoxyde diméthyle
dNTP :	desoxynucléotides triphosphates
DO ₆₀₀ :	densité optique à 600nm
DP :	2,2'- dipiridyl
DPTA :	acide 1,3-diaminopropane-N,N,N',N'-tétra-acétique
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
Fur :	ferric uptake regulator
G/M :	milieu minimum basé sur celui de Neidhardt <i>et al.</i> (1974)
GFP :	green fluorescent protein
HEPES :	acide N-2-hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthanesulfonique
kan :	kanamycine
LB :	milieu Luria-Bertani
<i>mntH</i> :	proton-dependent manganese transporter
MOI :	« multiplicity of infection »
MOPS :	acide 3-morpholinopropanesulfonique
NTA :	acide nitrilotriacétique
NRAMP :	« Natural Resistance-Associated Macrophage Protein »
pb :	paire(s) de bases

PBS :	« phosphate buffer saline »
PCR:	« polymerase chain reaction » réaction de polymérisation en chaîne
PEG :	polyéthylène glycol
RLU/S/DO1 :	Relative Light Units / par Seconde / par DO ₆₀₀ =1
SDS :	sodium dodécyl sulfate
SVF :	sérum de veau foetal
TBE :	Tris-borate EDTA
TPEN :	N,N,N',N'-tétrakis(2-pyridyl-méthyl)éthylènediamine
TSS :	« transformation and storage solution »
T ₄ PNK :	polynucléotide kinase T4
WT :	« wild type » type sauvage

1. Introduction

Les métaux tels que le fer et le manganèse sont des éléments qui se retrouvent habituellement en quantité limitante dans l'environnement des bactéries. Les bactéries ont donc des systèmes de transport qui leur permettent de s'approvisionner en métaux, même contre le gradient de concentration. Parmi ceux-ci, on retrouve les sidérophores (petites molécules qui captent le fer). Lorsque la bactérie se retrouve dans le corps d'un hôte animal, par exemple un humain, environ 78% du fer est complexé soit dans l'hème de l'hémoglobine ou de la myoglobine et environ 15% du fer intracellulaire est complexé à la ferritine.

Le fer remplit plusieurs fonctions dans la cellule bactérienne : une d'elles est de participer directement dans des réactions redox en changeant d'état d'oxydation entre Fe^{2+} et Fe^{3+} . Le fer se retrouve dans le noyau réactif de certaines enzymes telles que la ribonucléotide réductase (impliquée dans la synthèse de l'ADN), l'enzyme aconitase (impliquée dans le cycle de l'acide citrique), la catalase et la superoxyde dismutase (impliquées dans la destruction des radicaux oxygénés). On voit donc l'importance d'un bon approvisionnement de ce métal pour la bactérie et de la capacité à l'empêcher à réagir en l'entreposant dans des noyaux de protection intracellulaire très performants.

Pour ce qui est du manganèse, ses rôles dans le métabolisme bactérien comprennent la protection contre les stress oxydatif, en plus de son implication dans des réactions redox et la production d'oxygène lors de la photosynthèse. Malgré les rôles importants joués par le manganèse chez les bactéries, des concentrations infimes de ce métal sont suffisantes. Le manganèse peut également être cytotoxique s'il se retrouve à des très hautes concentrations.

Chez les procaryotes, les transporteurs MntH (proton-dependent manganese transporter) sont des homologues fonctionnels des transporteurs Nramp (Natural resistance-associated macrophage protein). Les protéines MntH ont été identifiées chez plusieurs espèces d'eubactéries. En tout, trois groupes de protéines MntH ont été identifiés (nommés A, B et C), avec le groupe C portant des similarités assez importantes avec certains Nramp eucaryotes. MntH est capable de transporter les cations divalents Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} . L'expression de *mntH* est régulée par la protéine Fur (Ferric Uptake Regulator) et peut donc être réprimée par l'excès de fer dans le milieu de croissance.

Le but premier de la recherche présentée dans ce mémoire de maîtrise était de caractériser la régulation du gène *mntH* de *E. coli*, afin de définir son rôle physiologique et évaluer son implication possible dans la virulence bactérienne.

Un deuxième volet de mon projet de maîtrise consistait dans la caractérisation des transporteurs de fer et manganèse chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Ce pathogène possède deux transporteurs de manganèse et fer, dont l'un d'eux est localisé dans un îlot de pathogénicité. Le serovar Typhimurium est un pathogène intracellulaire, alors afin d'étudier en détail l'effet des mutations affectant ces transporteurs, nous avons décidé de développer un outil qui permettrait de quantifier leur répllication à l'intérieur de la cellule hôte. Le but secondaire de mon projet de maîtrise était de développer cet outil de quantification de *Salmonella* Typhimurium dans le protocole de l'essai de résistance à la gentamicine.

2. Revue de littérature

2.1. Exemples de micronutriments métalliques

De nombreuses réactions chimiques impliquent des transferts d'électrons d'une molécule vers une autre et beaucoup de processus cellulaires font appel à ce type de réaction d'oxydo-réduction. La perte d'électrons par une molécule correspond à son oxydation tandis que le gain d'électrons correspond à sa réduction (Lodish *et al.*, 1997).

Les métaux tels que le Mn, Fe, et Zn sont considérés comme des micronutriments, à cause de leur grande importance et les quantités infimes auxquelles ils sont nécessaires chez les êtres vivants. Les activités biologiques des métaux Mn et Fe sont liées à la présence d'électrons libres qui permettent leur participation à des réactions d'oxydoréduction (redox). Le Zn ne possède pas de paire d'électrons libres, ce qui l'empêche de participer à des réactions d'oxydoréduction. Dans les systèmes vivants, ces métaux sont pour la plupart associés à des protéines, formant ainsi des métalloprotéines. Plusieurs des effets biologiques, surtout les effets toxiques, de ces micronutriments sont dus à leur capacité de catalyser l'initiation des réactions formant des radicaux libres. Les métaux peuvent cependant jouer un rôle soit pro-oxydant ou soit anti-oxydant, dépendant de la structure chimique du système où ils sont intégrés (Fraga, 2005).

2.1.1. Le fer

Le fer est un métal de transition, il existe sous deux formes interchangeables : l'état réduit ou fer ferreux (Fe^{2+}) et l'état oxydé ou fer ferrique (Fe^{3+}). Étant un métal de grande abondance sur la Terre, au cours de l'évolution le fer fut incorporé dans de nombreuses protéines chez la plupart des espèces. De plus, ses propriétés font de lui un composant très versatile pouvant posséder la fonction de donneur d'électrons ou biocatalyseur (Andrews *et al.*, 2003). Le fer remplit plusieurs fonctions dans la cellule bactérienne : une d'elles est de participer directement dans les réactions redox en changeant d'état d'oxydation entre Fe^{2+} et Fe^{3+} . Le fer se retrouve dans le noyau réactif de certains enzymes telles que la ribonucléotide réductase (impliquée dans la synthèse de l'ADN), l'enzyme aconitase (impliquée dans le cycle de l'acide citrique), la catalase et la superoxyde dismutase (impliquées dans la destruction des radicaux oxygénés) (Braun et Hantke, 2001). Il participe aussi à de nombreux processus biologiques incluant la photosynthèse, la méthanogenèse et la fixation de l'azote. Les propriétés redox du fer

sont très versatiles, ceci lui permet d'adopter le potentiel redox nécessaire afin de remplir ses fonctions biologiques (Andrews *et al.*, 2003).

Malgré son ubiquité, à cause de son insolubilité à pH neutre en aérobiose, le fer est pratiquement inaccessible aux organismes vivants. Les animaux supérieurs se procurent du fer en consommant d'autres organismes ayant déjà incorporé le fer dans leur système. Cependant les sources primaires telles que les bactéries, les champignons et les plantes se voient très limités en sources de fer, puisque ce dernier est précipité sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ en présence d'oxygène et possède une solubilité de 10^{-39} , ce qui limite sa disponibilité à pH 7 à environ 10^{-18} M (Drechsel et Jung, 1998). D'ailleurs, le fer est souvent séquestré dans des protéines telles que la lactoferrine, la transferrine et les ferritines, ou encore lié à l'anneau des protoporphyrines dans les hémoprotéines (Wandersman et Delepelaire, 2004).

Malgré tout, l'excès de fer lors de la croissance aérobique peut générer des radicaux oxygénés suite à la réaction de Fenton :



Les organismes possèdent alors des stratégies afin de maintenir l'homéostasie du fer à l'intérieur des cellules. Le but est donc de maintenir la concentration en fer à un niveau suffisant pour assurer les besoins métaboliques, mais assez bas afin d'éviter des dommages aux cellules aérobies (Massé et Arguin, 2005).

Chez l'humain, le fer fait partie intégrale de nombreuses protéines, une des plus importantes étant l'hémoglobine, protéine responsable du transport d'oxygène dans le corps (Müller *et al.*, 2005). Environ 2/3 du fer présent dans le corps humain est séquestré dans l'hémoglobine. Une portion équivalente à 14% est disponible pour les autres fonctions physiologiques et le restant circule dans le plasma sanguin lié au transporteur transferrine. Une légère déficience dans ce métal entraîne l'anémie et la fatigue corporelle, tandis qu'une déficience marquée dans ce micronutriment entraîne chez l'humain des troubles dans le fonctionnement au niveau cognitif et comportemental, ainsi qu'une susceptibilité accrue aux maladies infectieuses et à l'empoisonnement par les métaux lourds (WHO, 2001).

Il existe cependant des microorganismes capables de se passer de ce métal. Parmi eux, sont les lactobacilles qui sont adaptées à vivre dans des milieux hautement restreints en fer tel que le lait. Le pathogène *Borrelia burgdorferi*, ne possède aucun gène codant pour des métalloprotéines contenant du fer et sa croissance n'est pas affecté par l'absence de fer dans son milieu (Andrews *et al.*, 2003). Cet organisme semble avoir remplacé le fer pour le manganèse dans plusieurs de ses métalloprotéines (Posey et Gherardini, 2000).

2.1.2. Le manganèse

Le manganèse est un métal qui, comme le fer, peut se trouver sous deux formes : soit Mn^{2+} ou Mn^{3+} . Ce métal redox possède cependant un potentiel de réduction plus élevé que le fer dans la plupart des conditions biologiques, ce qui fait du manganèse un métal moins apte à donner son électron. La réaction $Mn^{3+} + e^- \rightarrow Mn^{2+}$ a un potentiel redox de +1,51V, tandis que la réaction équivalente impliquant le fer a un potentiel redox de +0,77V. Une valeur positive plus élevée indique un besoin élevé en énergie pour que la forme oxydée accepte un électron, donc de devenir réduit. Une des conséquences les plus remarquables de cette différence de potentiel entre les deux métaux est qu'en condition d'aérobie, le manganèse est beaucoup moins toxique pour les cellules puisque ce dernier ne génère pas des radicaux oxygénés avec la même facilité que le fer. Par exemple, l'ion Mn^{2+} possède un potentiel de réduction trop élevé pour réduire le peroxyde d'hydrogène en conditions aqueuses, ce qui n'est pas le cas pour le fer, rappelons la réaction de Fenton, qui consiste dans l'oxydation du fer (Kehres et Maguire, 2003).

Un des rôles qui a été attribué au manganèse dans le métabolisme bactérien est la protection contre les stress oxydatifs. Ce métal est aussi impliqué dans les réactions redox et la production d'oxygène (Cellier *et al.*, 2001). Les superoxyde-dismutases sont des enzymes très répandues chez les bactéries et archéobactéries. Cependant, il existe d'autres processus par lesquels le Mn^{2+} peut participer à la détoxification des radicaux libres. On compte parmi ces processus les catalases qui dépendent du manganèse, les Mn^{2+} peroxydases ainsi que la détoxification non-enzymatique par Mn^{2+} (Kehres et Maguire, 2003). Chez les organismes photosynthétiques, le manganèse joue un rôle important au niveau de la photosynthèse, servant comme catalyseur de l'oxydation du photosystème II par l'eau (Pittman *et al.*, 2005).

Malgré les rôles importants joués par le manganèse chez les organismes vivants des concentrations infimes de ce métal sont suffisantes. Le manganèse peut même devenir toxique pour la cellule s'il se retrouve à de très hautes concentrations (Makui *et al.*, 2000; Patzer et Hantke, 2001).

Chez l'humain, le manganèse est un micronutriment important se retrouvant dans la grande majorité des tissus. Il joue un rôle important dans le bon fonctionnement, entre autres du système immunitaire, dans la régulation des taux de sucre sanguin, de la reproduction et de la digestion. De plus, il joue un rôle important dans les mécanismes de défense contre les radicaux libres. Cependant, l'ingestion excessive de manganèse est associée à une condition médicale ayant des symptômes semblables à la maladie de Parkinson (Aschner et Aschner, 2005).

2.2. Transport du fer et de manganèse

2.2.1 Nramp1 et Nramp2 des vertébrés supérieurs

Le transport du fer et du manganèse peut se faire par une famille de transporteurs nommés Nramp (Patzer and Hantke, 2001 ; Kehres *et al.*, 2002) (natural resistance-associated macrophage proteins (Cellier *et al.*, 1995)). Les protéines appartenant à cette famille transportent les ions divalents (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) en fonction du pH (Salez et Malo, 2004). Des membres de la famille Nramp sont présents chez divers organismes vivants, et ce parmi plusieurs niveaux phylogéniques autant procaryotes qu'eucaryotes, par exemple : la drosophile, les levures, les oiseaux, les mammifères, les amphibiens et les plantes. La présence des protéines Nramp parmi une si grande diversité d'eucaryotes fait ressortir l'importance de l'homéostasie des métaux redox (Cellier *et al.*, 2001). Il a été proposé que les différents orthologues Nramp seraient tous dérivés d'un même ancêtre procaryote, ce transfert aurait eu lieu lors de l'incorporation des mitochondries en tant qu'organisme endosymbiotique. Les différents homologues Nramp eucaryotes possèdent un certain degré de conservation au niveau de la structure et du fonctionnement, en effet la complémentation d'une déficience en métaux divalents chez la levure (Pinner *et al.*, 1997) ou la drosophile (D'Souza *et al.*, 1999) est possible avec les protéines Nramp2 ou Nramp1 de mammifère, respectivement.

Le gène murin *Nramp1* a été identifié par clonage positionnel chez la souris. Il a été originalement appelé le locus *Ity/Lsh/Bcg*, puisque la protéine pour laquelle il code est

impliquée dans la résistance à certains pathogènes intracellulaires du macrophage, tel que *Salmonella Typhimurium*, *L. donovani* et *M. bovis* (BCG). Une autre appellation pour ce même gène est SLC11A1, pour *solute carrier family 11 member 1* (Fritsche *et al.*, 2003). Le produit de ce gène est une protéine à 12 segments transmembranaires, hydrophobe et ayant une boucle externe glycosylée (Vidal *et al.*, 1993), voir figure1. Chez la souris, Le polymorphisme G169D cause la production d'une protéine non-fonctionnelle qui entraîne une susceptibilité accrue contre les pathogènes intracellulaires déjà mentionnés (Vidal *et al.*, 1996). Dans les cellules phagocytaires, Nramp1 est rapidement recrutée vers la membrane des vésicules endosomales tardives, pour assumer la fonction de pompe à cations divalents (Gruenheid *et al.*, 1997; Malik *et al.*, 2005). Nramp1 servirait donc à dépléter les métaux à l'intérieur du phagosome (Cellier *et al.*, 2001 ; Roig *et al.*, 2002), ce qui pourrait limiter l'activité métabolique des particules ingérées et aiderait à la destruction des bactéries par bombardement avec des radicaux oxygénés et azotés. Puisque Nramp1 reste associée à la membrane jusqu'à la formation des phagolysosomes, elle rétablit le trafic normal du récepteur M6PR, protéine responsable du transport des enzymes lysosomales (Cuellar-Mata *et al.*, 2002; Salez et Malo, 2004). D'autres effets de l'expression de *Nramp1* qui ont été identifiés sont l'induction de CXCL10 (une chemokine), IL-1 β , TNF- α et IFN- γ (White *et al.*, 2004).

NRAMP1, l'homologue humain de *Nramp1*, est exprimé par les macrophages, les cellules dérivées des macrophages (Brenner, 2004). Chez l'humain, certains allèles du gène *NRAMP1* sont considérés comme des facteurs de risque menant à une susceptibilité accrue au pathogène intracellulaire *M. tuberculosis*. (Malik *et al.*, 2005)

L'absorption du fer chez l'humain se fait dans le duodénum, où le fer lié et non-lié à l'hème sont absorbés par deux voies différentes. Le fer non-lié à l'hème traverse les membranes apicales et basolatérales des enterocytes ciliés. Après être réduit en fer ferreux le transporteur de métaux divalents, DMT1 (Divalent Metal Transporter) ou NRAMP2, fait passer le fer à travers la membrane apicale. La protéine NRAMP2 est aussi exprimée dans d'autres tissus dans le corps, par exemple cette protéine est responsable de l'acquisition de fer par les érythroblastes (Kumar, 2005). NRAMP2 est une protéine électrogénique et dont l'activité dépend du voltage et des ions H⁺. Sa séquence démontre 78% d'identité en acides aminés par rapport à la protéine Nramp1 (Jabado *et al.*, 2000). Les propriétés fonctionnelles de NRAMP2 démontrent qu'elle nécessite, pour un

fonctionnement optimal, un milieu acide tel que dans la partie proximale du duodénum (Brenner, 2004).

Vu l'importance du fer dans le métabolisme humain, il n'est pas surprenant que des perturbations dans l'homéostasie du fer puissent être à la base de diverses maladies humaines tel que l'hémochromatose et l'anémie. Même si le gène *NRAMP2* n'est pas lui-même défectueux chez les patients souffrant de hémochromatose, il est surexprimé comparativement aux contrôles (Brenner, 2004).

2.2.2 MntH

Les transporteurs MntH (proton-dependent manganese transporter (Makui *et al.*, 2000; Ptazer and Hantke, 2001)), sont les orthologues bactériens des transporteurs Nramp. Ils ont été identifiés par la similarité de leur séquence avec les orthologues eucaryotes. (Cellier, 2004) L'étude de Makui *et al.* (2000), a démontré que MntH est capable de transporter les cations divalents Mn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , et Zn^{2+} , et possède une affinité apparente pour ces métaux dans l'ordre décrit. Patzer and Hantke (2001) et Kehres *et al.* (2002) rapportent qu'en effet les transporteurs MntH seraient très spécifiques au Mn^{2+} , cependant leur rôle physiologique dans le transport d'autres métaux ne peut pas être complètement exclu (Courville *et al.*, 2004).

En tout, trois groupes de protéines MntH ont été identifiés (nommés A, B et C), dont le groupe C portant des similarités assez importantes avec les Nramp eucaryotes. Les protéines du groupe A sont présentes autant dans les bactéries Gram+ et Gram- (ex : *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *M. tuberculosis* et *B. subtilis*) (Richer *et al.*, 2003). Il a été postulé que le groupe A serait apparu avant la différenciation des bactéries Gram+ et Gram- et que ce serait un membre de ce groupe qui serait à l'origine des gènes Nramp eucaryotes (Cellier *et al.*, 2001).

MntH de *E. coli* est une protéine à 11 segments transmembranaires, elle appartient au groupe A et possède un nombre de segments transmembranaires semblable à celui des levures (Courville *et al.*, 2004), voir figure 1. Les protéines du groupe B sont plutôt présentes chez des organismes strictement anaérobiques (ex : *C. tepidum* et *Clostridium acetobutylicum*), il est donc possible que ces gènes soient apparus tôt dans l'évolution lorsque la présence d'oxygène était négligeable (Cellier *et al.*, 2001). De plus, les séquences des protéines du groupe B sont très peu conservées entre elles et possèdent

peu de similarité avec les protéines des deux autres groupes et avec les protéines Nramp eucaryotes, ce qui suggère qu'elles auraient un lien plus proche avec l'ancêtre de MntH. Les protéines MntH du groupe C ont des séquences en acides aminés qui ressemblent à celles des protéines Nramp eucaryotes, beaucoup plus que les séquences d'autres MntH des groupes A ou B. De plus, contrairement aux protéines du groupe A, les similarités au niveau des séquences du groupe C ne sont pas en accord avec la classification phylogénique des espèces auxquelles elles appartiennent. D'ailleurs, il existe une grande proportion de microorganismes pathogènes appartenant au groupe C comparativement au groupe A ou B. D'après ces faits, il a été postulé que les gènes du groupe C auraient été acquis par transfert horizontal à partir des Nramp eucaryotes par des microorganismes opportunistes. Malgré ces différences, des membres du groupe C sont quand même capables d'effectuer le transport de métaux divalents chez *E. coli*, ce qui suggère une conservation au niveau fonctionnel (Richer *et al.*, 2003).

2.2.3. SitABCD

Vu l'importance des métaux divalents tel que le fer et le manganèse, il est concevable que plusieurs transporteurs seraient requis pour l'approvisionnement de ces métaux chez les bactéries. En effet, il a été remarqué que les mutants *Salmonella* Typhimurium $\Delta mntH$ étaient tous aussi virulents que les souches sauvages lors de l'inoculation des souris BALB/cJ (Nramp1^{-/-}) (Kehres et Maguire, 2003) ou encore des souris 129/SvJ (Nramp^{-/-}) (Boyer *et al.*, 2002). Une des raisons est que *Salmonella* Typhimurium possède un deuxième transporteur de fer et de manganèse ayant environ les mêmes affinités pour ces métaux que MntH, il s'agit du transporteur SitABCD, membre de la famille de transporteurs ABC (ATP-binding cassette). L'opéron *sitABCD* se retrouve dans l'îlot de pathogénicité de *Salmonella* 1 (SPI-1) et il est requis pour que la bactérie soit virulente lors de l'infection des souris *in vivo* (Boyer *et al.*, 2002, Zaharik *et al.*, 2005). Des homologues de cet opéron ont été repérés chez plusieurs espèces pathogènes tel que *Yersinia pestis* (Bearden *et al.*, 1998), *Shigella flexneri* (Runyen-Janecky *et al.*, 2003), *Streptococcus pneumoniae* (Marra *et al.*, 2002), *Enterococcus faecalis* (Low *et al.*, 2003) et certaines souches pathogènes de *E. coli* telles que CFT073 et χ 7122 (Sabri *et al.*, 2005). Des homologues possibles ont aussi été repérés chez certaines archéobactéries tel que *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Archeoglobus fulgidus* et *Pyrococcus abyssi* (Kehres et Maguire, 2003).

D'après les observations de Kehres *et al.* (2002) et Sabri *et al.* (2005), SitABCD aurait une activité optimale à pH alcalin, chez *Salmonella* Typhimurium et *E. coli* χ 7122 respectivement. Contrairement à MntH qui fonctionne de façon optimale dans un milieu acide, SitABCD a une activité très restreinte à pH < 6.5. Cependant, tout comme MntH, SitABCD est capable de transporter d'autres métaux divalents tel que le Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} et le Zn^{2+} (Kehres *et al.*, 2002), voir figure 1. Un autre point en commun entre ces deux transporteurs est la régulation de la transcription des gènes, tous les deux sont régulés par MntR, Fur et leur expression est régulée à la hausse par la présence de H_2O_2 (Kehres et Maguire, 2003).

2.2.4 Les sidérophores et les hémophores

Malgré l'abondance du fer sur terre, il est souvent très difficile pour les bactéries de l'acquérir pour subsister à leur besoins, puisqu'il se retrouve la plupart du temps sous des formes insolubles. Afin de remplir leurs besoins métaboliques en fer, les microorganismes possèdent plusieurs systèmes d'acquisition, en plus des récepteurs déjà discutés. Les systèmes d'acquisition de fer chez les bactéries fonctionnent selon deux mécanismes : le premier implique leur contact direct entre la bactérie et le substrat et le deuxième fait appel à des molécules spécialisées synthétisées et relâchées dans le milieu par la bactérie pour récupérer le fer, appelées sidérophores (Wandersman et Delepelaire, 2004), voir figure 2.

Ces molécules sont souvent excrétées dans le milieu et sont solubles dans l'eau, cependant il existe des sidérophores qui ne sont pas du tout excrétés tel que les mycobactines (synthétisées par les mycobactéries) qui restent liées à l'enveloppe cellulaire (Winkelmann, 2002). Toutes les molécules classifiées comme des sidérophores ont les trois caractéristiques suivantes : 1. biosynthèse régulée par le fer 2. chélateur de fer ferrique et 3. transport actif à travers la membrane cellulaire (Drechsel et Jung, 1998).

Les sidérophores sont des composés de faible masse moléculaire ayant une très haute affinité pour le fer : ils sont produits par des bactéries, certains champignons (Winkelmann, 2002) et certaines plantes (Drechsel et Jung, 1998). Plus de 500 sidérophores provenant surtout des bactéries Gram+ et Gram- ont été identifiés, leur synthèse ne se fait pas dans les ribosomes, mais plutôt par des enzymes spécialisées et ils ont une structure générale très semblable, c'est-à-dire un squelette peptidique composé d'analogues d'acides aminés (Drechsel et Jung, 1998).

Figure 1. Rôle des transporteurs de métaux divalents dans l'infection

Chez les macrophages de la souris, Nramp1 joue un rôle de défense contre divers pathogènes (ex. *Salmonella Typhimurium*, *Mycobacterium bovis* (BCG) et *Leishmania donovani*). Nramp1 fonctionne en tant que transporteur de métaux divalents et évacue le fer des compartiments endosomaux. Le fer transporté vers le cytosol pourrait alors être stocké dans la ferritine ou servir à produire des radicaux oxygénés et azotés.

Les bactéries de leur côté possèdent différents systèmes spécialisés dans l'acquisition de fer, qui incluent les sidérophores, MntH, SitABCD (ou des homologues) et FeoB. De plus les bactéries possèdent aussi des mécanismes de défense contre les radicaux oxygénés.

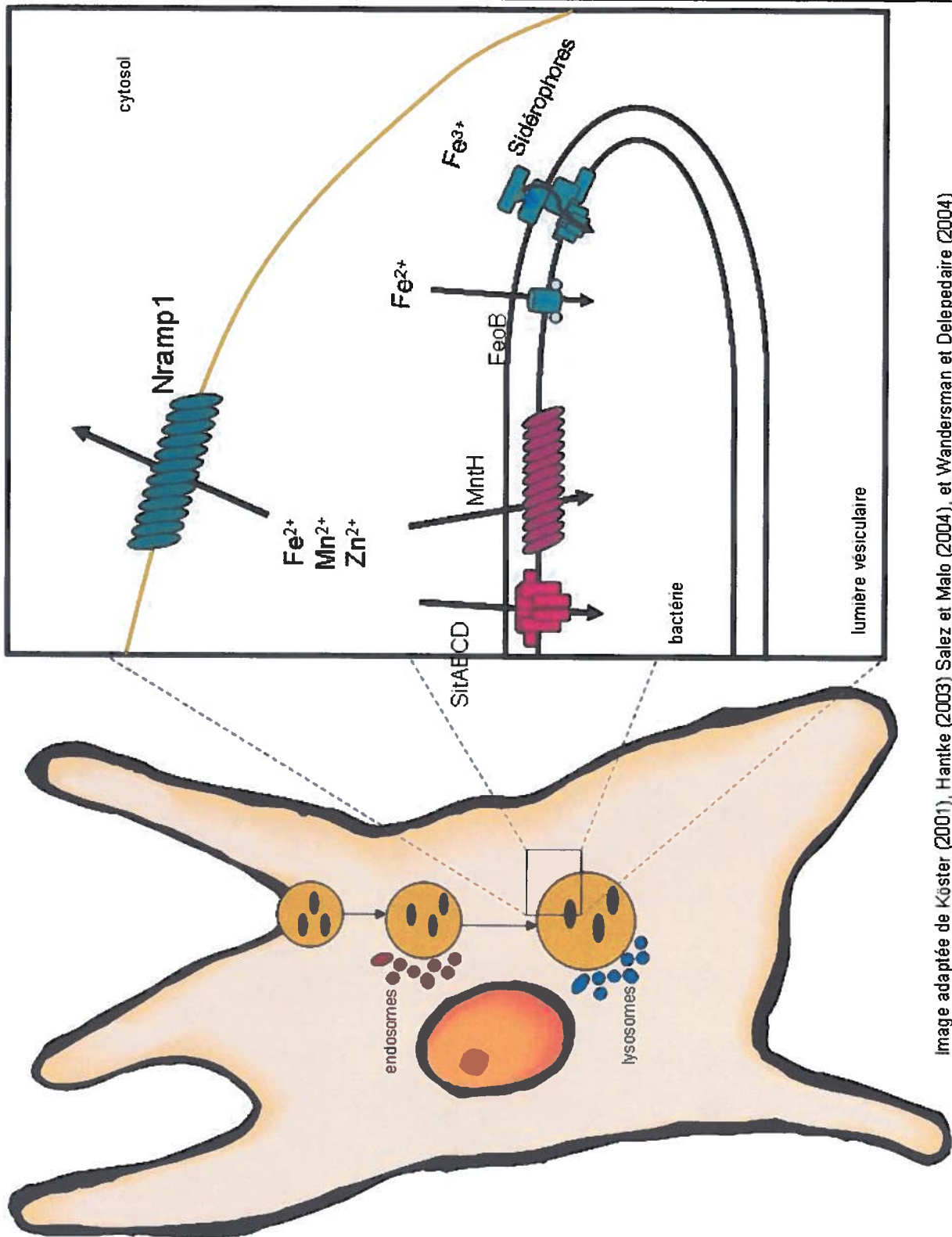


Image adaptée de Küster (2001), Hanke (2003) Salez et Malo (2004), et Wandersman et Delepedaire (2004)

Les groupements chélateurs de fer sont classés selon leur structure chimique soit : les hydroxamates (aérobactine, ferrichrome), les dérivés de l'acide dihydrobenzoïque ou catéchols (entérobactine) et les hydroxyacides (pyochéline) (Wandersman et Delepelaire, 2004; Winkelmann 2002). Il a été remarqué que les microorganismes ont tendance à produire des sidérophores contenant un groupement de façon prédominante, et que ceci dépend de l'environnement dans lequel ils vivent. Par exemple, les sidérophores catéchols sont prédominants chez les entérobactéries, le genre *Vibrio*, les Azotobactéries et les Agrobactéries. Tandis que les bactéries Gram+ telles que les Streptomycètes produisent surtout des sidérophores avec des groupements hydroxamates (Winkelmann, 2002).

Parmi les nombreux sidérophores qui existent, l'entérobactine (entérocheline) est un des mieux connus. Il a été isolé en 1970 par deux groupes différents chez *E. coli* (O'Brien et Gibson) et *Salmonella* Typhimurium (Polack et Neillands) et depuis de nombreuses études ont visé sa caractérisation (Raymond *et al.*, 2003). En tout, il y a 14 gènes impliqués dans la voie d'acquisition du fer par l'entérobactine, ils sont organisés en 6 opérons qui prennent origine dans trois régions promotrices bidirectionnelles régulées par Fur (Crosa et Walsh, 2002).

Les sidérophores sont essentiels à la croissance des microorganismes et plusieurs sont requis pour la pathogénicité de certaines bactéries (Schlak *et al.*, 2004), voir figure 1. En plus d'acquérir le fer à partir des hydroxydes ou à partir des surfaces solides, les sidérophores peuvent aussi extraire le fer à partir de composés tels que le citrate ferrique, le phosphate ferrique, la transferrine, la ferritine ou encore les sucres contenant du fer, les pigments flavone des végétaux et même à partir de chélateurs artificiels comme l'EDTA (Winkelmann, 2002). Chez certaines souches de *E. coli* uropathogènes et *Salmonella* Typhimurium, des variants structurels de l'entérobactine ont été identifiés et nommés salmochelines. Ces sidérophores semblent être les principaux types de sidérophores produits par ces pathogènes. Il semblerait que l'usage préférentiel des salmochelines plutôt que les entérobactines s'explique par le fait que l'entérobactine est séquestrée par la sidérocaltine (lipocaline 2), ce qui réduirait leur efficacité dans l'hôte (Hantke *et al.*, 2003; Bister *et al.*, 2004). Les salmochelines sont simplement des entérobactines possédant un résidu glucosyl sur un ou deux des anneaux DHB (2,3-dihydroxybenzoyl). (Hantke *et al.*, 2003; Fischbach *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005). Le groupement de gènes *iroBCDEN*, aussi appelé locus *iroA*, est responsable pour la glucosylation de l'entérobactine et le transport

des salmochelines. IroB est responsable de la glucosylation de l'entérobactine (Hantke *et al.*, 2003 ; Fischbach *et al.*, 2004), IroD et IroE sont des hydrolases cytoplasmiques et périplasmiques, respectivement (Lin *et al.*, 2005), IroC est soupçonné d'être un transporteur lié à la membrane cytoplasmique (Zhu *et al.*, 2005) et IroN est le transporteur lié à la membrane externe qui est responsable de l'internalisation du complexe sidérophore(Fe^{3+}) de manière dépendante de TonB (Hantke *et al.*, 2003).

D'autres moyens que possèdent les bactéries pour se procurer le fer sont les hémophores. Tout comme les sidérophores, ce sont des protéines excrétées dans le milieu, qui captent l'hème et permettent la fixation par un récepteur spécifique sur la membrane externe. Jusqu'à date les hémophores n'ont été identifiés que chez des bactéries Gram-. Chez *H. influenzae*, un pathogène qui requiert l'hème exogène pour la croissance aérobique, on a identifié l'hémophore HxuA. Un autre système d'hémophore connu, HasA (haem acquisition system), a été identifié chez *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Yersinia pestis*, et *Y. enterocolitica*. Les protéines impliquées dans la production de l'hémophore, de la protéine de sécrétion et du récepteur membranaire sont codés par l'opéron *has* et partagent une organisation génétique similaire chez les différentes espèces (Wandersman et Delepelaire, 2004).

2.2.5 FeoB

Depuis qu'il a été décrit pour la première fois en 1987 chez *E. coli* K-12 (Hantke, 1987), le système de transport de fer ferreux *feo* (**f**errous iron transport), a aussi été trouvé chez plusieurs autres espèces bactériennes (Hantke, 2003), voir figure 1. Les gènes qui codent pour ce système, *feoAB*, identifiés chez les différentes espèces ont un très haut degré d'homologie entre eux, malgré que *feoA* soit parfois absent. FeoA est une protéine de 75 acides aminés qui semble avoir une certaine homologie avec le domaine C-terminal du répresseur DxtR, tandis que FeoB est une protéine de 773 acides aminés qui avait été classée en tant qu'ATPase, mais qui a été plus tard identifiée en tant que GTPase possédant un site conservé lui permettant de lier le fer (Andrews *et al.*, 2003). Chez les mutants Δfeo de *E. coli*, certains gènes d'acquisition du fer incluant les sidérophores sont déréprimés, de plus des mutants FeoB *E. coli* et *Salmonella enterica* sont incapables de coloniser l'intestin murin (Wandersman et Delepelaire, 2004).

Classée d'abord en tant que transporteur de Fe^{2+} , un nouvel homologue FeoB a été identifié chez *Porphyromonas gingivalis* en tant que transporteur de manganèse. Cette

Figure 2. Organisation générale des systèmes d'acquisition de fer utilisant sidérophores chez les bactéries Gram- et Gram+

- A.** Chez les bactéries Gram-, les complexes sidérophores(Fe^{3+}) sont captés par les cellules à l'aide des récepteurs de haute affinité qui se trouvent sur la membrane externe. Le complexe est internalisé dans le périplasma, un processus qui requiert de l'énergie fournie par TonB, qui forme complexe de trois protéines (TonB, ExbB et ExbD) lié à la membrane cytoplasmique (Wandersman et Delepelaire, 2004). Lors de la liaison du sidérophore à son récepteur membranaire, ce dernier subit un changement de conformation, ce qui entraîne une affinité accrue du récepteur pour TonB. L'interaction du récepteur membranaire et le complexe TonB se fait par la région N-terminale du récepteur membranaire qui comporte une région très conservée appelée la « boîte Ton » (Wiener, 2005). Le complexe TonB transduit alors l'énergie nécessaire pour permettre le passage du complexe sidérophore(Fe^{3+}) vers l'espace périplasmique (Wandersman et Delepelaire, 2004). Une fois dans le périplasma, le complexe sidérophore(Fe^{3+}) est lié par une protéine périplasmique soluble (PBP = periplasmic binding protein) qui l'achemine vers une perméase liée à la membrane interne pour qu'il puisse traverser vers le cytosol (Wiener, 2005). Lorsque le complexe sidérophore(Fe^{3+}) est dans le cytoplasme, le fer doit être libéré pour être utilisé par la cellule. Deux voies ont été proposées pour décrire ce processus : dans la première, le fer ferrique (Fe^{3+}) serait réduit en fer ferreux (Fe^{2+}) par des réductases, ce qui résulterait dans la perte d'affinité du sidérophore pour son substrat. Le sidérophore vide serait alors recyclé suite à son excrétion vers le milieu. Dans la deuxième voie, on propose que le complexe sidérophore(Fe^{3+}) serait complètement dégradé par des enzymes, ce qui impliquerait que le sidérophore n'est pas recyclé (Wandersman et Delepelaire, 2004).
- B.** Chez les bactéries Gram+, comme les mycobactéries, les sidérophores se lient sur un récepteur ancré dans la membrane (Wandersman et Delepelaire, 2004). Ces récepteurs forment un complexe avec des protéines intégrales membranaires et des ATP-hydrolases qui fournissent de l'énergie au complexe. Cependant, il n'existe pas de complexe TonB associé au système d'acquisition de sidérophores chez les bactéries Gram+ (Köster, 2001).

A.

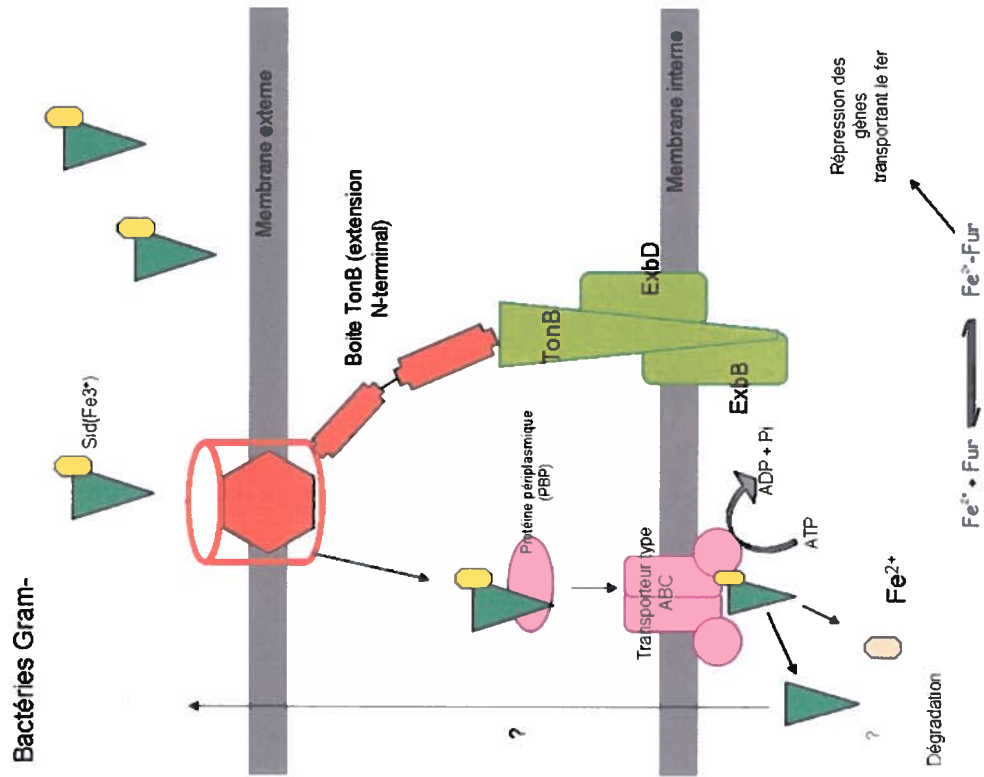


Image adaptée de Andrews et al. (2003), Wandersman et Delepédare (2004), Schalk et al. (2004)

B.

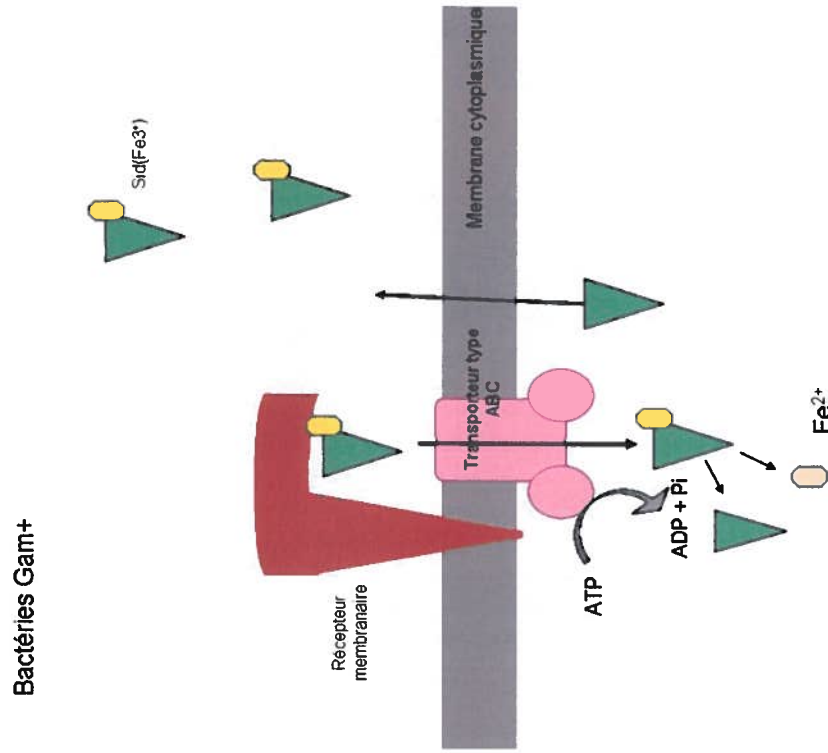


Image adaptée de Andrews et al. (2003) et Wandersman et Delepédare (2004)

bactérie qui est l'agent étiologique principal de la périodontite chronique est une coccobacille Gram-, anaérobie qui possède deux gènes homologues *feoB*, le premier servant à transporter le fer et le deuxième à transporter le manganèse (Dashper *et al.*, 2005).

2.3 Régulation par le fer et le manganèse dans les bactéries

2.3.1. Fur et DxtR

La protéine Fur (ferric uptake regulator) est un répresseur transcriptionnel de nombreux gènes bactériens impliqués dans l'acquisition de fer, ainsi que des gènes n'ayant peu de liens avec l'homéostasie du fer (Hantke, 2001; Bellini et Hemmings, 2006).

Au dessus de 100 gènes provenant de différentes souches de *E. coli* sont régulés par Fur, parmi eux on trouve des gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores, des gènes codant pour des transporteurs de fer et manganèse comme *mntH* et l'opéron *sitABCD* (Ikeda *et al.*, 2005), mais on trouve aussi des gènes impliqués dans le métabolisme de la cellule et dans la réponse au stress oxydatif (Massé et Arguin, 2005). Certains gènes ne sont pas réprimés, mais plutôt induits par Fur, par exemple *sodB* et *acnA*, des gènes impliqués respectivement dans la réponse au stress oxydatif et le métabolisme de la cellule. Il a été proposé que le mécanisme d'activation de *sodB* par Fur résulte d'une augmentation de la stabilité de l'ARNm (Hantke, 2001; Andrews *et al.*, 2003). Cette augmentation de la stabilité est due à l'interaction entre Fur et *ryhB* qui code pour RyhB, un ARN antisens régulé par une boîte Fur. Le rôle de RyhB est d'inhiber la traduction des ARNm ciblés en conditions pauvres en fer (Wandersman et Delepelaire, 2004; Massé et Arguin, 2005).

Lorsque les concentrations intracellulaires en fer sont élevées, Fur lie les ions de fer ferreux. Ceci induit un changement de conformation de la protéine, qui résulte en son activation. Cette protéine Fur activée peut alors lier une séquence spécifique, appelée la boîte Fur, localisée dans la région du promoteur des gènes impliqués dans l'acquisition de fer. Ces gènes sont alors réprimés et l'entrée de fer est arrêtée (Tiss *et al.*, 2005). Des analyses d'empreinte à la DNase I de différents promoteurs ont servi pour identifier la séquence palindromique de 19 pb de la boîte Fur, qui est : GATAATGATAATCATTATC. Cette séquence exacte n'est pas présente dans le génome de *E. coli*, certains sites de liaison de Fur ne correspondent qu'à 11/19 pb (Hantke, 2001; Andrews *et al.*, 2003).

Fur est un homodimère, le domaine C-terminal possède deux sites de liaison de métaux riches en résidus His, cette région serait importante pour la dimérisation de la protéine, le domaine N-terminal est impliqué dans la liaison à l'ADN. Dans la protéine Fur de *E. coli*, un des deux sites de liaison est occupé par un ion Zn^{2+} lié à deux résidus Cys. Le site de liaison actif qui est occupé normalement par Fe^{2+} peut être occupé *in vitro* par Mn^{2+} , Co^{2+} et d'autres métaux divalents (Hantke, 2001).

Le gène *fur* est localisé dans l'opéron bicistronique *fldA-fur*, cet opéron est régulé à la hausse par SoxRS en réponse aux superoxydes. De plus, Fur possède son propre promoteur et son expression est autorégulée de façon négative ; cependant son expression est augmentée par OxyR mais à plus bas niveau que par SoxRS. L'augmentation de Fur lors du stress oxydatif, implique une augmentation de la liaison de fer dans le cytosol, ainsi que la répression de l'acquisition de fer et l'augmentation de l'emmagasinement de fer dans la cellule (Andrews *et al.*, 2003).

Chez les bactéries Gram+, des protéines semblables à Fur, tel que DxtR et PerR ont été identifiées. *Corynebacterium diphtheriae* possède ce type de répresseur, qui contrôle les gènes d'acquisition de fer mais aussi des gènes impliqués dans la virulence, en particulier le gène de la toxine diphtérique (Wandersman et Delepelaire, 2004). Même s'il n'y a pas de similarité dans la séquence entre ces protéines, elles partagent tout de même une forte similarité au niveau structural (Hantke 2001). Il avait été proposé lors de sa découverte que DxtR serait spécifique aux bactéries Gram+ et Fur aux bactéries Gram- cependant des nouvelles données indiquent que la plupart de microorganismes possèdent des protéines qui ressemblent aux deux (Andrews *et al.*, 2003).

Le transporteur de zinc de type ABC est régulé chez plusieurs microorganismes par une protéine semblable à Fur, appelée Zur. Les résidus Cys trouvés dans Fur sont conservés dans Zur, cependant la région de liaison sur le promoteur appelée « boîte Zur » ne présente aucune ressemblance à la boîte Fur (Hantke, 2001).

2.3.2 MntR

De nombreux orthologues Fur sont présents chez des bactéries Gram- et certaines bactéries Gram+ possédant un taux bas en GC. Ces protéines ont des séquences semblables à Fur, mais reconnaissent des corépresseurs différents et remplissent des rôles régulateurs dans la cellule (Bellini et Hemmings, 2005). Le régulateur MntR, qui

répond aux concentrations intracellulaires en manganèse est impliqué dans la régulation de *mntH* et *sitABCD* (Kehres et Maguire, 2003).

Dans l'étude publiée par Ikeda *et al.* (2005), il a été démontré que MntR et Fur peuvent être activés par le fer et le manganèse, respectivement, et sont jusqu'à un certain point interchangeables dans la répression de *mntH* et *sitABCD* quoique avec une efficacité réduite.

2.4 Stress oxydatif

Les réactions redox, sont inévitables dans les systèmes vivants, elles proviennent du métabolisme catabolique et anabolique des cellules. Chez les eucaryotes, la compartimentation de la cellule assure une certaine protection contre certaines réactions redox (Farr et Kogoma, 1991; Green et Paget, 2004). Les bactéries n'ont pas une structure qui leur permet de ségréger leurs processus cellulaires les uns des autres, mais parviennent tout de même à garder l'équilibre intracellulaire et éviter les dommages aux protéines, à l'ARN et à l'ADN (Farr et Kogoma, 1991). Toute perturbation à l'équilibre intracellulaire doit immédiatement être compensée et les bactéries possèdent des mécanismes sensibles et spécifiques pour contrôler ces stress (Zheng et Storz, 2000).

2.4.1. Types d'oxydants

Les radicaux oxygénés sont produits par le métabolisme aérobique de la cellule (Storz et Imlay, 1999). Par exemple, la production de peroxyde d'hydrogène à partir de l'oxygène moléculaire est catalysée par des enzymes qui participent à la chaîne respiratoire (Farr et Kogoma, 1991). L'oxygène moléculaire (O_2) est très peu réactif et forme des radicaux libres lorsqu'il devient accepteur d'électrons. Sa capacité de réaction augmente au fur et à mesure qu'il accepte des électrons, il forme de façon séquentielle :

1. le radical superoxyde (O_2^-) 2. le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et 3. le radical hydroxyle ($OH^\cdot$). Sous conditions acides O_2^- peut être converti en radical hydroperoxyde ($HOO^\cdot$) (Green et Paget, 2004; Farr et Kogoma, 1991), voir aussi figure 3.

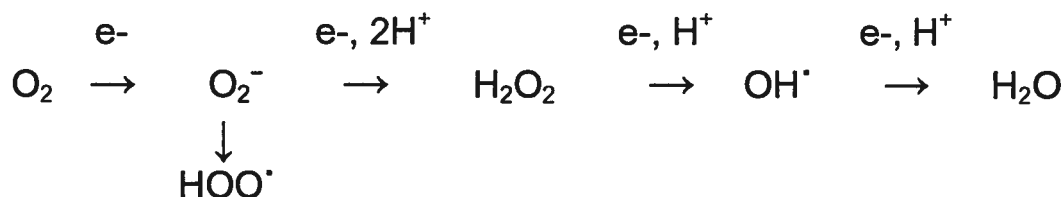
La production non-enzymatique de radicaux oxygénés peut provenir de l'auto-oxydation des composants cellulaires, tel que des thiols, des catéchols, des flavines et des ubiquinol (Storz et Imlay, 1999). Sous forme réduite, les métaux de transition comme le fer, peuvent aussi être responsables de la production de radicaux oxygénés. Le peroxyde

d'hydrogène provient de la dismutation de O_2^- soit spontanée ou catalysée par SOD (Farr et Kogoma, 1991). Les radicaux hydroxyles peuvent être formés suite à la radiolyse de l'eau ou encore par la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène (dans la réaction de Fenton) (Touati, 2000).

Les radicaux superoxydes ont tendance à oxyder les thiols, l'ascorbate, les tocophérols et les catécholamines. Des enzymes qui contiennent des groupements soufrés $(Fe-S)_4$ sont aussi très sensibles aux radicaux superoxydes (Farr et Kogoma, 1991). Puisque ces enzymes utilisent les groupements $(Fe-S)_4$ pour lier et déshydrater leur substrats, l'oxydation par O_2^- provoque la désintégration du groupement et la perte d'activité enzymatique. La désintégration du groupement réactif, provoque une augmentation du fer libre dans le cytosol et augmente leur réaction avec le peroxyde d'hydrogène (Storz et Imlay, 1999; Touati, 2000). Le peroxyde d'hydrogène est une molécule très instable et qui réagit très rapidement avec les métaux divalents (ex. le fer), résultant dans la production de radicaux hydroxyles capables d'endommager entre autres l'ADN. Le peroxyde d'hydrogène peut aussi réagir directement avec les cystéines dans les groupements thiols des enzymes (Storz et Imlay, 1999; Kiley et Storz, 2004).

Un autre type d'agent oxydant pouvant potentiellement endommager les cellules vivantes est l'oxyde nitrique (NO). À basse concentration, le NO est une molécule de signalisation, mais il devient extrêmement nocif à haute concentration car il réagit avec les noyaux d'hème et les groupements $(Fe-S)_4$. Le NO peut aussi réagir avec les anions superoxydes et générer du peroxynitrite ($OONO^-$), qui peut être décomposé en $OH^\bullet$ et $NO_2^\bullet$ (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Storz et Imlay, 1999).

Figure 3. Étapes dans la production des différents radicaux oxygénés



2.4.2. Mécanismes de détoxification

La réponse déclenchée suite à un stress oxydatif dépend de l'oxydant, les mécanismes de détoxification sont nombreux et parfois peuvent se chevaucher (Mongkolsuk et Helmann, 2002). *E. coli* possède plusieurs gènes servant à maintenir l'homéostasie et aussi à répondre en cas de stress, certains permettent de dégrader les oxydants tandis que d'autres codent pour des régulateurs détectant les niveaux élevés d'oxydants (Storz et Imlay, 1999). La réponse cellulaire suite à la présence de O_2^- et de l'oxyde nitrique est médiée par le facteur de transcription SoxR. Il provoque, entre autres l'augmentation de l'expression de *soxS*; le produit de ce gène, SoxS, induit à son tour l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes tels que *sodA* (superoxyde dismutase dépendante du manganèse), *fumC* (fumarase C), *fur* (ferric uptake regulator) et *acnA* (aconitase) (Zheng et Storz, 2000; Andrews *et al.*, 2003). Les enzymes SodB (superoxyde dismutase dépendante du fer) et SodC (superoxyde dismutase dépendante du cuivre et zinc) sont aussi impliquées dans la détoxification des anions superoxydes, cependant leur expression n'est pas régulée directement par SoxR, mais par Fur (Andrews *et al.*, 2003).

La protéine SoxR est un homodimère qui contient un groupement $(Fe-S)_4$ par sous unité (Zheng et Storz, 2000). En présence d'oxygène, les groupements $(Fe-S)_4$ sont à l'état réduit. Il est tout de même capable de lier le promoteur de *soxS*, mais il est incapable de l'activer (Green et Paget, 2004). En présence d'anions superoxyde les groupements $(Fe-S)_4$ deviennent oxydés, ce qui permet la distorsion de l'activateur SoxR du promoteur *soxS* permettant sa liaison avec l'ARN polymérase et sa transcription. Les groupements $(Fe-S)_4$ deviennent rapidement réduits après détoxification des anions superoxydes et la transcription de *soxS* arrête. L'activation de SoxR par l'oxyde nitrique implique la nitrosylation des groupements $(Fe-S)_4$, ce qui entraîne son activation (Green et Paget, 2004).

La réponse cellulaire au stress oxydatif causé par le peroxyde d'hydrogène ou les peroxydes organiques tel que le *tert*-butyl hydroperoxyde est régulée par OxyR (Farr et Kogoma, 1991; Storz et Imlay, 1999). OxyR est un activateur transcriptionnel, membre de la famille LysR et présent autant dans les bactéries Gram+ que Gram-. OxyR forme des tétramères en solution aqueuse (Zheng et Storz, 2000) et possède six groupements thiol (Green et Paget, 2004). Le mécanisme d'activation par OxyR implique l'interaction directe avec le peroxyde d'hydrogène. Cette interaction résulte dans l'activation de la protéine

par l'oxydation d'une de ces cystéines, plus spécifiquement le résidu Cys199. Cette oxydation entraîne la formation de l'intermédiaire instable Cys-acide sulphénique (Cys-SOH). Ce changement structural permet l'interaction entre la protéine et l'ADN ainsi que l'ARN polymérase (Mongkolsuk et Helman, 2002).

Parmi les gènes activés par OxyR on trouve *katG* (hydroperoxydase), *ahpCF* (alkyl peroxyde réductase), *oxyS* (ARN régulateur), *dps* (protéine apparentée à la ferritine qui lie l'ADN), *fur* (régulateur de l'acquisition de fer) (Zheng et Storz, 2000; Green et Paget, 2004) et *mntH* (transporteur de manganèse et fer dépendant du proton) (Kehres et Maguire, 2003).

3. Matériel et Méthodes

3.1 Souches bactériennes, cellules et milieux de culture

Le tableau 1 décrit toutes les souches bactériennes utilisées lors de ce projet. Les cultures en milieu riche ont été effectuées dans du milieu Luria-Bertani (LB) à faible teneur saline (Miller 1992). Pour faire le milieu LB solide 15 g/L d'agar sont ajoutés. L'agar mou utilisé dans les tests de diffusion sur disque contient 7 g/L d'agar. Les antibiotiques utilisés comme marqueurs de sélection ont été ajoutés dans le milieu lorsque nécessaire aux concentrations suivantes : ampicilline (100 µg/mL), kanamycine (30 µg/mL), spectinomycine (100 µg/mL), chloramphénicol (10 µg/mL) et streptomycine (50 µg/mL). Le milieu R a été utilisé pour effectuer les lysats de phages. Il contient 10 g/L de tryptone, 1g/L d'extrait de levure, 8 g/L de NaCl, 2mM CaCl₂, 0,1% glucose et soit 12 g/L ou 8 g/L d'agar. Les expériences en milieu minimum ont été effectuées dans du milieu G/M composé de tampon MOPS (pH 7,4) (40 mM sulfonate morpholinopropane, 9,5 mM NH₄Cl, 0,276 mM K₂SO₄, 0,7 µM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 5 mM Na-β-glycérophosphate, 0,2% glycérol et des concentrations variables de FeSO₄ et de NTA (présent en quantité 10 fois plus grande que le fer) (Makui *et al.*, 2000). Le FeSO₄ a été dilué dans du HCl 0,1N et le NTA était dilué dans l'eau stérile. Les concentrations de fer utilisées dans les expériences varient entre 0,01M et 1 X10⁻⁶M avec des intervalles de 10X.

Les cellules RAW 264.7 (ATCC No. TIB-71) étaient cultivées dans du milieu DMEM High Glucose (Gibco BRL) SVF 10% décomplémenté à 55°C pendant 30 minutes, 2 mM L-glutamine, 25 mM HEPES (Invitrogen Life Technologies). La geneticine (G-418, Life Technologies) 1mg/mL a servi pour sélectionner l'expression de *Nramp1* dans la lignée RAW264.7 clone 13. Lors du maintien hebdomadaire des cellules 10 mL/L de Pen/Strep (Sigma) étaient ajoutés au milieu. Les cellules étaient incubées dans des pétris de 100 x 15 mm ayant une surface peu adhérente Corning Ultra Low Binding Surface (Corning Inc.) ou Sarstedt Cell Culture Dishes for Adherent Cells (Sarstedt, Allemagne).

Tableau 1. Souches bactériennes

Nom	Génotype ou caractéristiques	Obtention	Source ou références
Souches de <i>E. coli</i>			
MG1655 (K-12)	F ⁻ λ ⁻ rph-1		Heath <i>et al.</i> , 1992
EMG2 (K-12)	F ⁺ λ ⁺		Heath <i>et al.</i> , 1992
CFT073 (K-2)	Isolat clinique (urosepsis) O6 :K2 :H1, hlyA ⁺ , iroBCDEN, iut/iuc		Mobley <i>et al.</i> , 1990; Welch <i>et al.</i> , 2002
QC2398	oxyR :: kan		Danielle Touati
S17λ pir	Lysogène du phage λ, contient le gène permettant la réplication des plasmides avec un réplicon RK6		Boyer <i>et al.</i> , 2002
DH1	F ⁻ glnV44 recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^r) thi1 hsd R17(r _k -m _k +) relA1		Isabelle Bergevin, (mémoire de maîtrise 2003)
QC1732	GC4468 Δfur :: kan		Compan et Touati, 1993
PmntH-luc	EMG2 PmntH-luc		Isabelle Bergevin, (mémoire de maîtrise 2003)
EMG2 fur	EMG2 fur :: kan		Isabelle Bergevin, (mémoire de maîtrise 2003)
EMG2oxyR	EMG2 oxyR :: kan	P1 (QC2398) x EMG2	Cette étude
EMG2mntHoxoR	EMG2 PmntH-luc oxyR :: kan	P1 (QC2398) x EMG2 PmntH-luc	Cette étude
MG1655 PmntH-luc	PmntH-luc		Isabelle Bergevin (mémoire de maîtrise 2003)
MG1655 oxyR	MG1655 oxyR :: kan	P1 (QC2398) x MG1655	Cette étude
MG1655 PmntH-luc oxyR	MG1655 PmntH-luc oxyR :: kan	P1 (QC2398) x MG1655 PmntH-luc	Cette étude
MG1655 fur	MG1655 fur :: kan	P1 (QC1732) x MG1655	Cette étude
MG1655 PmntH-luc fur	MG1655 PmntH-luc fur :: kan	P1 (QC1732) x MG1655 PmntH-luc	Cette étude
CFT073 PmntH-luc	PmntH-luc		Isabelle Bergevin (non-publié)
Souches <i>Salmonella</i> Typhimurium			
WT	Isolat clinique Keller <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		Robson <i>et al.</i> , 1972
MS	WT mntH :: Cm, sitA :: Sm		Boyer <i>et al.</i> , 2002
M2S	WT mntH :: km sitA :: Sm		Frédéric Veyrier (mémoire de maîtrise 2005)
WT.790LVA	WT STM790 :: GFPmut3LVA		Cette étude
WT.4454LVA	WT STM4454 :: GFPmut3LVA		Cette étude
MS.790LVA	MS STM790 :: GFPmut3LVA		Cette étude
MS.4454LVA	MS STM4454 :: GFPmut3LVA		Cette étude

Tableau 2. Plasmides

Nom	Caractéristiques	Source ou références
pGBM6	Réplicon pSC101 (mutant), Plac, (spec/strep) ^r , compatible pMB1	Manen <i>et al.</i> , 1997
pTnmntH	Dérivé de pTnModCm sans le gène Tn5, contenant le cadre de lecture complet de <i>mntH</i> , (Cm ^r)	Boyer <i>et al.</i> , 2002
pP _{tac} GFPmut2_OVA	GFP_OVA dans pKK223-3 (colE1 <i>bla</i> Ptac <i>rrnB</i>)	Bumann, 2001
pP _{pagC} GFPmut3LVA	GFP_LVA dans pP _{pagC} GFP_OVA	Bumann, (non-publié)
pJBA111	Apr; pUC18Not-PA1/04/03-RBSII-GFP(LVA)-T0-T1	Andersen <i>et al.</i> , 1998
pJBA113	Apr; pUC18Not-PA1/04/03-RBSII-GFP(ASV)-T0-T1	Andersen <i>et al.</i> , 1998
pJBA110	Apr; pUC18Not-PA1/04/03-RBSII- GFP(LAA)-T0-T1	Andersen <i>et al.</i> , 1998
pJBA112	Apr; pUC18Not-PA1/04/03-RBSII- GFP(AAV)-T0-T1	Andersen <i>et al.</i> , 1998
pPoxyR	Cadre de lecture complet de <i>oxyR</i> (<i>E. coli</i>) dans pGBM6	Cette étude
pPfur	Cadre de lecture complet de <i>fur</i> (<i>E. coli</i>) dans pGBM6	Cette étude
pP _{tac} GFPmut3LVA	GFPmut3LVA dans pP _{tac}	Cette étude
pJBA111LC	pJBA111 avec le réplicon de pKK223-3	Cette étude
pTn790	STM790 dans pTnmntH	Cette étude
pTn4454	STM4454 dans pTnmntH	Cette étude
pTn790GFPmut3*	GFPmut3* dans pTn790	Cette étude
pTn790GFPmut3LVA	GFPmut3LVA dans pTn790	Cette étude
pTn790GFPmut3ASV	GFPmut3ASV dans pTn790	Cette étude
pTn790GFPmut3AAV	GFPmut3AAV dans pTn790	Cette étude
pTn790GFPmut3LAA	GFPmut3LAA dans pTn790	Cette étude

3.2 Produits chimiques et réactifs de biologie moléculaire

Les chélateurs de métaux utilisés comme inducteurs sont le dipyridyl (DP), le bathophenanthrolinedisulfonique disodique (BPS), le N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridyl-méthyl)éthylènediamine (TPEN) et l'acide 1,3-diaminopropane-N,N,N',N'-tetraacétique (DPTA). Les dilutions ont été préparées, dans du milieu LB, 30 minutes avant d'être mises en présence des cellules. Une solution de lyse fraîche a été préparée pour chaque expérience. Celle-ci contient du lysozyme frais (5 mg/mL) (Roche biochemicals) et du réactif de lyse cellulaire 2X (Promega) + BSA (5mg/mL) (Fischer Biotech), dans un rapport 1 : 2. Les enzymes de restriction utilisées pour les clonages moléculaires provenaient de

New England Biolabs Ltd. (NEB, Mississauga, ON). La ligase T4 provenait de Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON) ou de NEB.

3.3 Protocoles généraux de biologie moléculaire

3.3.1 Extraction d'ADN plasmidique et d'ADN génomique

Les extractions plasmidiques ont été effectuées selon les directives incluses dans les trousse provenant de la compagnie QIAGEN.

Les extractions de plasmides pour fins de vérification ont été effectuées avec la méthode à lyse alcaline (Engbrecht *et al.*, 1992) avec la modification suivante : l'étape phénol-chloroforme a été éliminée et l'ADN a été resuspendu dans 20 µL de tampon d'élution « EB » provenant de la trousse QIAGEN « QIAprep Spin Miniprep ».

Afin d'extraire l'ADN génomique, 5 mL de culture saturée a été centrifugée dans un tube de 15 mL pendant 15 minutes à 5200 rpm dans le rotor JA-17. Le culot a été resuspendu dans 2,835 mL de tampon TE. Une fois homogène, 150 µL de SDS 10% et 15 µL de protéinase K (20 mg/mL) ont été rajoutés. Le tube a été placé pendant 30 minutes à 50°C. Un volume additionnel de 15 µL de protéinase K a été rajouté et le mélange a été placé sur le rotateur pendant 5 minutes à la température ambiante. Il a ensuite été incubé à 50°C pendant 30 minutes. Un volume de 500 µL de NaCl préchauffé à 65°C a été rajouté et le tube a été placé sur le rotateur pendant 5 minutes. Par la suite 400 µL de CTAB/NaCl préchauffé à 65°C ont été rajoutés et le tube a été placé pendant 5 minutes sur le rotateur puis incubé pendant 10 minutes à 65°C. Un volume de 4 mL de chloroforme-alcool isoamyl (24 :1) a été rajouté et le tout a été mélangé sur le rotateur pendant 90 minutes. Le tube a été centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 rpm dans le rotor JA-17. La phase aqueuse a été transférée dans un tube propre en polypropylène à laquelle ont été rajoutés 4 mL de phénol-chloroforme-alcool isoamyl (25 :24 :1). Le tube a ensuite été placé sur le rotateur pendant 30 minutes pour être de nouveau centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 rpm dans le rotor JA-17. L'étape d'extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamyl a été répétée 2 fois de plus. Après 3 extractions, la phase aqueuse a été centrifugée pendant 10 minutes à 9000 rpm dans le rotor JA-20. Le surnageant a été soigneusement transféré dans un tube de 15 mL et l'ADN a été extrait en ajoutant 0,6 volumes d'isopropanol et en mélangeant très lentement par inversion. Le filament qui résultait correspondait à l'ADN et il a été extrait à l'aide d'un embout de

micropipette et transféré dans un tube de 1,5 mL. L'ADN a été resuspendu en ajoutant 100 μ L d'eau MilliQ stérile et solubilisée en plaçant le tube à 65°C pendant 5 minutes puis sur glace pendant 1 minute.

3.3.2 Préparation des cellules électro-compétentes et électroporation

Les bactéries électro-compétentes ont été préparées de la façon suivante : une culture de 16 heures en milieu riche a été diluée 1/100 dans 500 mL de milieu riche LB. Les bactéries ont été incubées jusqu'au début de la phase exponentielle ($DO_{600} = 0,6$). La culture a par la suite été refroidie sur glace pendant 15-30 minutes, par la suite elle a été centrifugée à 4°C (20 minutes à 4500rpm dans le rotor JA10 d'une centrifugeuse Beckman J-21B ou J2-21M, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). Le surnageant a été décanté avec beaucoup de soin et les culots ont été dispersés par brassage (en agitant le tube soigneusement) puis suspendus dans un volume de 25 mL d'eau MilliQ stérile froide. Après homogénéisation, 100 mL d'eau MilliQ stérile froide ont été rajoutés. Les bactéries ont été par la suite centrifugées à 4°C (20 minutes à 4500rpm dans le rotor JA10 de la centrifugeuse Beckman). Ces deux dernières étapes ont été refaites une fois de plus. Le culot a été par la suite dispersé dans une solution froide de glycérol 10% et le mélange a été transféré dans un tube de 13mL pour être centrifugé à 4°C (20 minutes à 4500rpm dans le rotor JA20 de la centrifugeuse Beckman). 500 μ L de glycérol 10% ont été rajoutés au culot et homogénéisé. La totalité du mélange a été répartie dans des tubes de 1.5mL en aliquots de 50 μ L par tube et les tubes ont été placés pendant quelques secondes sur la glace sèche. Les aliquots ont été conservés pendant un maximum de 3-4 mois à -75°C.

La transformation des cellules compétentes est effectuée de la façon suivante : des cellules compétentes décongelées dans un bain de glace ont été transférées dans une cuvette d'électroporation de 0,1 cm (Bio-Rad Laboratories), ensuite environ 1-2 μ L d'ADN a été rajouté aux cellules. L'appareil de marque Bio-Rad Gene-Pulser a été réglé de la façon suivante : 1,6 kV, 25 μ F de capacitance et 400 Ω de résistance. Afin de permettre l'expression des gènes de sélection dans les cellules transformées, celles-ci ont été incubées pendant 1 heure dans 1 mL de milieu SOC (20g/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). Après cette incubation les cellules ont été étalées sur milieu LB agar sélectif.

3.3.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'enzyme utilisée pour amplifier des fragments d'ADN utilisés pour les clonages était la polymérase *Pfu* (Invitrogen). Les réactifs ont été préparés de la façon suivante : 1 μ L d'ADN (à une concentration d'environ 1-5 ng/ μ L pour les plasmide et 50 ng/ μ L pour l'ADN génomique), $MgSO_4$ (2 - 12 mM concentration finale), 1 mM dNTP (1 μ L de chaque à une concentration initiale 5 pmol/ μ L) et 0,2 μ L de polymérase *Pfu*. L'appareil utilisé était le PTC-100 Programmable Thermal Controller de MJ Research Inc. Les programmes étaient réglés de la façon suivante : 5 minutes à 95°C pour une première dénaturation, suivi de 30 cycles composés de 45 secondes à 94°C, 45 secondes d'hybridation à la température convenable pour chaque amorce, un temps d'hybridation adapté selon la longueur du fragment attendu à 72°C. Une période supplémentaire d'élongation de 10 minutes à 72°C a été rajoutée à la fin des 30 cycles. La température d'hybridation a été calculée pour chaque amorce de la façon suivante : +4°C pour chaque G ou C, +2°C pour chaque T ou A, à ce total a été soustrait 5°C. Le temps d'élongation a été calculé selon le nombre de paires de bases attendues, soit 1 minute pour chaque 0,5 kilobase.

3.3.4 Enzymes de digestion et de modification

Les réactions enzymatiques ont été effectuées avec les tampons fournis par les manufacturiers tout en suivant leurs protocoles. Le temps de réaction pour la déphosphorylation était de 1 heure à 37°C. Le temps de réaction pour les digestions variait d'un minimum de 1,5 heures à un maximum de 16 heures selon l'efficacité de l'enzyme et la qualité du matériel à digérer. La température des réactions était celle qui était suggérée par le manufacturier.

La purification du matériel traité avec des enzymes de digestion et de modification s'est effectuée avec les trousse de purification de la compagnie QIAGEN (« QIAquick PCR Purification Kit », « QIAquick Gel extraction Kit » et QIAquick Nucleotide Removal kit ») en utilisant les tampons et les protocoles fournis par le manufacturier.

3.3.5 Électrophorèse

L'électrophorèse des fragments d'ADN a été effectuée dans des gels d'agarose 1%. Pour la purification des fragments d'ADN, des gels d'agarose 0,8% étaient utilisés afin de permettre une meilleure séparation des fragments. Tous les gels d'agarose

ont été préparés avec le tampon Tris-borate-EDTA 0,5X (TBE 0,5X). La migration des fragments d'ADN a été effectuée dans le même tampon, à un voltage de 90V pour les purifications et 140V pour les analyses dans une cuve à électrophorèse « Owl Easy Cast Minigel System » (Owl Operation Systems, Portsmouth, NH). Les fragments d'ADN ont été colorés dans un bain de bromure d'éthidium (500 µg/L) pendant 30 minutes. La révélation a été effectuée par rayonnement UV et les photographies ont été faites avec l'appareil « BIO-RAD Gel Doc 1000 » (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Tableau 3. Amorces utilisées pour les réactions de polymérase en chaîne. Les mutations introduites sont indiquées en gras et les sites de restriction sont soulignés.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence et sites de restriction
oripJBA111-F	5'-CCT <u>CCG</u> ATC <u>GTT</u> GTC AGA AG (<i>Pvu</i> I)
oripJBA111-R	5'-AGC <u>GGA</u> ATT <u>CCG</u> CCC AAT ACG (<i>Eco</i> R I)
oripKK223-F	5'-ACA <u>ACG</u> ATC <u>GGA</u> GGA CCG AA (<i>Pvu</i> I)
oripKK223-R	5'-GGC <u>GGA</u> ATT <u>CCG</u> CTT CCT CG (<i>Eco</i> R I)
POxyR-F	5'-AGC <u>GAA</u> <u>TTC</u> TGG AGA TCC GC (<i>Eco</i> R I)
POxyR-R	5'-AAC ACT <u>CTA</u> <u>GAG</u> TAC TTC GTC AA (<i>Xba</i> I)
PFur-F	5'-ACA <u>GAA</u> <u>TTC</u> TGA AGA GTT GCA T (<i>Eco</i> R I)
PFur-R	5'- CGT <u>TCT</u> <u>AGA</u> TTA TCA GCA GTG TC (<i>Xba</i> I)
TonB-F	5'-CCT <u>GCG</u> <u>GCC</u> <u>GCG</u> CAG CCG A (<i>Not</i> I)
TonB-R	5'-CCT CGC <u>GCG</u> <u>GTA</u> <u>CCC</u> GTT GAG T (<i>Kpn</i> I)
SitA-F	5'-TAA <u>GCG</u> <u>GCC</u> <u>GCA</u> GAT AAA GCT (<i>Not</i> I)
SitA-R	5'-CAC TAT <u>AGG</u> <u>TAC</u> <u>CAA</u> ATT ATT GC (<i>Kpn</i> I)
STM790-F	5'-GAT <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>CGC</u> AAG CTG GA (<i>Not</i> I)
STM790-R	5'-CGT <u>CGG</u> <u>TAC</u> <u>CGT</u> CGC GAT (<i>Kpn</i> I)
STM4454-F	5'-GAT CAG <u>CGG</u> <u>CCG</u> <u>CTT</u> GAT CTT A (<i>Not</i> I)
STM4454-R	5'-ACA <u>GGG</u> <u>TAC</u> <u>CCG</u> GCA GGC C (<i>Kpn</i> I)

3.3.6 Construction du plasmide permettant la complémentation de la mutation $\Delta oxyR$

La complémentation de la mutation *oxyR* dans les souches EMG2 et MG1655 a été effectuée à l'aide du plasmide pPoxyR comportant le cadre de lecture complet du gène *oxyR* sous le contrôle de son propre promoteur. Cette région de 1202 pb a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces POxyR-F et POxyR-R à partir de l'ADN génomique de la souche EMG2 WT. La région amplifiée par PCR et le plasmide pGBM6 ont été digérés par les enzymes *EcoR* I et *Xba* I. Après la digestion les fragments ont été isolés à l'aide des kits de purification sur gel de QIAGEN. La ligation s'est effectuée pendant 16 hrs à 12°C. Des cellules DH1 électrocompétentes ont été transformées avec le produit de ligation. Les clones obtenus ont été vérifiés par leur profil de digestion enzymatique et par la résistance conférée à la spectinomycine. Les plasmides ont été extraits à l'aide du kit QIAGEN puis utilisés pour transformer des cellules MG1655 $\Delta oxyR$, EMG2 $\Delta oxyR$, MG1655 *PmntH-luc* $\Delta oxyR$ et EMG2 *PmntH-luc* $\Delta oxyR$ par la méthode TSS. Les clones MG1655 et EMG2 pPoxyR obtenus à partir de cette transformation ont été vérifiés à l'aide des tests de diffusion en milieu solide en présence de H₂O₂.

3.3.7 Construction du plasmide permettant la complémentation de la mutation Δfur

La complémentation de la mutation Δfur dans les souches EMG2 et MG1655 a été effectuée à l'aide du plasmide pFur comportant le cadre de lecture complet du gène *fur* sous le contrôle de son propre promoteur. La région de 1000 bp a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces PFur-F et PFur-R à partir de l'ADN génomique de la souche EMG2 WT. La région amplifiée par PCR et le plasmide pGBM6 ont été digérés par les enzymes *EcoR* I et *Xba* I. Après la digestion les fragments ont été isolés à l'aide des kits de purification sur gel de QIAGEN. La ligation a été effectuée pendant 16hrs à 12°C. Des cellules DH1 électrocompétentes ont été transformées avec le produit de la ligation. Les clones obtenus ont été vérifiés par leur profil de digestion enzymatique et par la résistance conférée à la spectinomycine. Les plasmides ont été extraits à l'aide de la trousse QIAGEN puis introduits dans des cellules MG1655 *PmntH-luc* Δfur et EMG2 *PmntH-luc* Δfur par la méthode TSS. Les mutants Δfur ayant un niveau d'expression constitutif pour le gène *mntH*, il est possible de vérifier la complémentation de la mutation Δfur en suivant le taux d'expression.

3.3.8 Construction des plasmides suicides pTnSitA et pTntonB

Afin d'interrompre le cadre de lecture des gènes *sitA* et *tonB* dans la souche CFT073, des plasmides capables d'effectuer une simple recombinaison homologue ont été construits. Pour chacun des gènes, une région interne d'environ 650 pb a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche CFT073 WT, à l'aide des amorces SitA-F et SitA-R pour le gène *sitA* et TonB-F et TonB-R pour le gène *tonB*. Les fragments et le vecteur pTnmntH (Boyer *et al.*, 2002) ont été digérés par KpnI et NotI. Les fragments ont été purifiés sur gel à l'aide du kit QIAGEN. Après la ligation, des bactéries S17λpir ont été transformées avec chacun des plasmides. Ces souches ont par la suite été utilisées pour effectuer l'interruption de chacun des gènes dans CFT073 par conjugaison.

3.4 Conjugaison

Les conjugaisons ont été effectuées selon la méthode décrite dans Boyer *et al.* (2002). 50 µL ont été pris de la souche donneuse et la souche receveuse à partir de cultures saturées après 16 heures pour ensemer 50 mL de milieu LB pour chacune. Ces cultures ont été incubées à 37°C jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO₆₀₀ de 0,6. Afin de combiner les deux souches, 500 µL de chacune ont été déposées dans un tube de 1,5 mL pour être centrifugées à 8000 rpm pendant 1 minute dans une centrifugeuse de table (Heraeus). Une fois le surnageant enlevé, le culot a été resuspendu dans 100 µL LB. La totalité de ce volume a été déposée sur une gélose LB non sélective sans être étalé, puis incubé face vers le haut à 25°C pendant 18 heures. Afin de recueillir les exconjugants, 1 mL de milieu LB a été ajouté sur la gélose et des dilutions en série 1 :10, 1 :50 et 1 :100 ont été préparées dans du LB. Un volume de 100 µL de ces dilutions a été étalé sur gélose sélective contenant l'antibiotique acquis par la souche receveuse ainsi qu'un deuxième antibiotique absent dans la souche donneuse. Lorsque la souche receveuse était *Salmonella* Typhimurium, une deuxième étape de criblage était nécessaire, c'est-à-dire l'étalement sur gélose bismuth agar, *Escherichia coli* ne croît pas sur ce milieu.

3.5 Transductions

Les transductions chez *E. coli* ont été effectuées à l'aide du phage P1vir, tandis qu'elles ont été effectuées à l'aide du phage P22 chez *Salmonella* Typhimurium.

Préparation de phage P1vir à partir de la souche lysogénique SGSC4226. Cette méthode est décrite dans Miller 1992 (A short course in bacterial genetics, Laboratory manual)

La souche SGSC4226 provenant du SGSC (Salmonella Genetic Stock Center) est lysogène pour le phage P1vir procurant la résistance au chloramphénicol. Pour la préparation des phages P1cm, des cultures saturées incubées à 30°C pendant 16 heures ont été diluées 1 :10 dans 10 mL de LB. Elles ont été incubées à 30°C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de ~0,2-0,3. La température de l'incubateur a par la suite été ajustée à 45°C et la culture a été incubée pendant 20 minutes. L'incubation s'est poursuivie pendant 2 heures à 42°C. La totalité de la culture a été transférée dans un tube de polypropylène de 15 mL, 5 gouttes de chloroforme ont été ajoutées puis vortexée pendant 30 secondes. Elle a par la suite été centrifugée à 4000 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été récupéré et reparti dans plusieurs tubes de 1,5 mL, 3 gouttes de chloroforme ont été ajoutées à chaque tube. Les tubes ont été entreposés à 4°C.

Préparation de lysats de phage P22 et P1vir sur milieu solide

Des cultures de *Salmonella* Typhimurium de 16 heures ont été diluées 1 :50 dans 3 mL de LB contenant 5 mM CaCl₂. Les tubes ont été placés sur le bain-marie à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,3. 10⁷ pfu (*plaque forming units*) de phage ont été ajoutés à 1 mL de culture puis incubés à 37°C pendant 20 minutes. 2.5 mL de R-Top agar ont été ajoutés puis versés sur une gélose R. Les géloses ont été incubées à l'endroit pendant 16 heures à 42°C. Afin de récolter les lysats, 1 mL de LB a été ajouté à l'agar mou et gratté avec un étaloir jetable. Il a été versé dans un tube de polypropylène de 15 mL et 5 gouttes de chloroforme ont été ajoutées. Les tubes ont été brassés vigoureusement puis centrifugés à 4500 x g pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré dans un tube de polypropylène de 15 mL et 2 gouttes de chloroforme ont été ajoutées avant que les tubes soient entreposés à 4°C.

3.6 Induction du gène *mntH* de *E. coli* en milieu minimum G/M MOPS

Les expériences en milieu minimum se sont déroulées sur trois jours et une nuit. Une culture de chaque souche a été incubée pendant 16 heures (1 colonie pour 2mL de milieu LB). Le lendemain matin une culture a été incubée pendant huit heures (20µL de bactéries pour 2 mL de milieu LB). Pendant la journée le milieu G/M a été préparé. Vers la fin de la journée, la densité optique ($\lambda=600\text{nm}$) a été enregistrée. Les cellules ont été lavées avec du milieu G/M sans ions. La quantité nécessaire pour avoir une DO_{600} égale à 0,05 a été inoculée dans 2 mL de milieu G/M FeSO_4 10 µM. Quatre tubes ont été préparés pour chaque souche. Les cultures ont été incubées pendant 24 heures. Le lendemain, du milieu G/M frais avec différentes concentrations de Fe et NTA a été préparé. À la fin des 24 heures d'incubation, la DO_{600} a été mesurée pour chaque souche. La quantité de bactéries nécessaire pour obtenir une DO_{600} égale à 0,05 a été inoculée dans 2 mL de milieu G/M ayant différentes concentrations de FeSO_4 . Les cultures ont alors été incubées pendant exactement 16 heures. La lyse cellulaire, les mesures de l'expression de luciférase et l'interprétation des résultats se sont déroulées tel que décrit pour l'induction en milieu LB.

3.7 Induction du gène *mntH* de *E. coli* par différents chélateurs de métaux et par des agents oxydatifs

Toutes les étapes jusqu'à la lyse cellulaire ont été effectuées sous conditions stériles. Une culture de chacune des souches a été incubée pendant 16 heures à 37°C avec agitation. À partir de cette culture, une dilution 1 :40 a été incubée environ 1 heure 30 minutes, ou jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} de 0,6, puis placée dans un bain de glace. Une fois la densité optique désirée obtenue, les dilutions d'inducteurs 10X ont été préparées. Celles-ci ont été incubées à la température de la pièce pendant 30 minutes. Dans des tubes de 15 mL, 1,8 mL de culture bactérienne a été ajouté à 200 µL de d'une dilution d'inducteur 10X. Tous les essais ont été réalisés en duplicata. L'incubation en présence de l'inducteur a duré 45 minutes (induction en phase exponentielle) ou 16 heures (induction en phase stationnaire). Suite à l'incubation en présence d'inducteur, les cultures ont été placées dans un bain de glace afin d'arrêter la croissance. La DO_{600} a été mesurée pour chacun des tubes. Le protocole utilisé pour la lyse cellulaire est celui du « Luciferase Assay System » de Promega, avec les modifications suivantes : 90 µL de culture a été lysée. Pour effectuer la réaction avec la luciférine, 10 µL du lysat ont été

placés dans un tube de culture en verre, à ceci étaient ajoutés 45 µL de luciférine lors de la lecture. La lecture au luminomètre a été effectuée pour une période de 25 secondes. Pour chaque échantillon, la donnée la plus élevée obtenue au luminomètre a été divisée par la densité optique mesurée à la fin de l'induction. Les résultats sont donc exprimés en RLU/S/DO1 (Relative Light Units / par Seconde / par DO₆₀₀=1).

3.8 Tests de diffusion en milieu solide

Des cultures de 16 heures ont été diluées (1/100 ou 1/40 pour les mutants à croissance plus lente) dans du milieu LB non-sélectif et incubées jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,6. Cent microlitres de cette culture ont été mélangés à 3mL d'agar LB mou et étalés sur gélose LB non sélectif. Un disque fait de papier Whatman No. 2 de 7 mm de diamètre a été imprégné de 10 µL de la solution oxydante et placé ensuite au milieu de la gélose. Les géloses ont été incubées pendant 16 heures à 37°C, après quoi le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré.

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 $p < 0,05$ et ils étaient considérés hautement significatifs lorsque $p < 0,01$. Le test de t-Student a été effectué avec le programme JMPIN[®] version 3.2.6 (SAS Institut Inc.).

3.9 Test de sensibilité à la gentamicine

(Protocole basé sur Boyer *et al.*, (2002) avec des modifications)

Quarante microlitres de culture saturée de *Salmonella* Typhimurium ont servi à inoculer 2 mL de milieu LB non-sélectif. Les tubes ont été placés dans un incubateur à 37°C sans agitation pour une période de 18 heures. Les cellules RAW 267.4 (ATCC No. TIB-71) ont été préparées de la façon suivante : l'incubation des cellules a été effectuée dans le milieu DMEM (2 mM L-glutamine, 4,5 g/L glucose, 10% SVF, 25 mM HEPES) sans Pénicilline/Streptomycine pour au moins deux passages. La veille de l'expérience, les cellules ont été décollées à l'aide d'une pipette de 5 mL et recueillies dans un tube à centrifugation de 50 mL. Elles ont été centrifugées à 1500 rpm pendant 7 minutes dans une centrifugeuse Sorvall. Le culot a été resuspendu dans 10 mL de milieu DMEM et les cellules ont été comptées à l'aide d'un hémacytomètre. La concentration a été ajustée à 1×10^6 cellules/mL. L'interféron-γ murin a été ajouté à la suspension pour une concentration finale de 1 U/mL. Les cellules ont été aliquotées dans des plaques de

24 puits en raison de 5×10^5 cellules par puits dans 500 μ L de milieu. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 18 heures. Le lendemain, le milieu DMEM a été remplacé par du milieu frais sans interféron- γ et l'incubation poursuivie à 37°C, 5% CO₂ pendant la préparation des bactéries. Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 9000 rpm dans une centrifugeuse de table et resuspendues dans un volume égal de PBS 1X à 4°C. La DO₆₀₀ a été mesurée et ajustée à 0,9. Des dilutions en série (1 :10, 1 :100, 1 :1000) ont été effectuées dans du PBS 1X à 4°C. Cinq microlitres de chaque dilution a été ajouté à un puits, selon la multiplicité d'infection désirée. Pour déterminer la dose infectieuse exacte, des dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} préparées à partir de la culture bactérienne à DO₆₀₀ = 0,9 dans du PBS 1X ont été étalées sur des géloses LB non-sélectives. Les plaques ont été centrifugées à 350 x g pendant 10 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Sorvall pour permettre l'adhésion des bactéries aux cellules. Ceci a été suivi d'une incubation à 37°C, 5% CO₂ pendant 20 minutes afin de permettre l'internalisation des bactéries. Les puits ont été lavés deux fois avec 750 μ L de PBS 1X à température ambiante suivi de l'ajout de 500 μ L de milieu DMEM préchauffé à 37°C contenant 100 μ g/mL de gentamicine. Les plaques ont été incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 45 minutes pour éliminer les bactéries extracellulaires. Les plaques ont ensuite été lavées deux fois avec 750 μ L de PBS 1X à température ambiante suivi de l'ajout de 500 μ L de milieu DMEM préchauffé à 37°C contenant 50 μ g/mL de gentamicine et de l'incubation à 37°C, 5% CO₂ pendant 6, 9 ou 12 heures. À la fin de l'incubation et pour la plaque qui servait de T=0, 1 mL de PBS 1X (0,1% TritonX-100) a été ajouté, suivi d'une incubation de 5 minutes à 37°C, 5% CO₂. Le volume total a été recueilli dans un tube stérile et des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ont été étalées sur gélose LB non-sélective.

3.10 Construction du plasmide pP_{tac}GFPmut3LVA

Le premier plasmide pP_{tac}GFPmut3LVA a été construit en remplaçant le cadre de lecture de la GFPmut2_OVA dans le plasmide pP_{tac}GFPmut2_OVA (Bumann, 2001). Les plasmides pP_{tac}GFPmut2_OVA et P_{pagC}GFPmut3LVA ont été digérés par *Xba*I et *Hind*III, afin d'isoler le cadre de lecture de la protéine en laissant le promoteur intact. Le fragment mut3LVA d'environ 900 pb a été inséré dans le plasmide pP_{tac} et électroporé dans des cellules DH1. Les clones obtenus ont été vérifiés par la résistance aux antibiotiques et par l'intensité de fluorescence émise (décrit plus bas).

Aucun clone fluorescent n'a été obtenu à partir du clonage décrit plus haut, il a alors été décidé de changer de stratégie. Le plasmide pJBA111LC a été construit en échangeant l'origine de répllication du plasmide pJBA111 (Andersen *et al.*, 1998) par l'origine de répllication du plasmide pP_{tac}GFPmut2_OVA. Le plasmide pP_{tac}GFPmut2_OVA est construit sur la base du vecteur pKK223-3 (Amersham Pharmacia) (Bumann, 2001) et se trouve à environ 25 copies par cellule (Miki *et al.*, 1987), tandis que le plasmide pJBA111 est présent à environ 500 copies par cellule. Une région d'environ 1400 pb qui incluait l'origine de répllication du plasmide pP_{tac}GFPmut2_OVA et la région terminale du gène β -lactamase a été amplifiée en utilisant les amorces oripJBA111-F et oripJBA111-R. Une région correspondant a gène de la GFPmut3LVA incluant le promoteur et la région proximale du gène β -lactamase a été amplifiée en utilisant les amorces oripKK223-F et oripKK223-R. Les deux fragments ont été digérés par *EcoR* I et *Pvu* I et purifiés sur gel à l'aide de la trousse « QIAGEN Gel extraction kit ». Suite à la ligation, le nouveau plasmide a été électroporé dans des cellules DH1. Les clones obtenus ont été vérifiés par la résistance à l'ampicilline et par l'intensité de fluorescence émise (décrit plus bas).

3.11 Construction des plasmides pTn4454GFPmut3LVA et pTn790GFPmut3LVA

Les plasmides suicides ont été construits à partir du plasmide pTnmntH (Boyer *et al.*, 2002). La première étape consistait à amplifier les régions internes de deux pseudogènes STM790 et STM4454, choisis à l'aide de l'annotation génétique disponible au Genome Sequencing Center, Washington University in St-Louis (<http://genomeold.wustl.edu>). Le plasmide pTnmntH a été digéré avec *Kpn* I et *Not* I afin d'enlever le fragment du gène *mntHSty*. Les fragments correspondant aux régions internes de deux pseudogènes ont été digérés avec *Kpn* I et *Not* I puis insérés dans le plasmide par ligation, ce nouveau plasmide a été électroporé dans des cellules S17 λ pir. Les clones obtenus ont été vérifiés par le patron de restriction avec les enzymes *Kpn* I et *Not* I. La cassette complète du gène GFPmut3LVA a été extraite à partir du plasmide pJBA111 par digestion avec *Not* I. Le fragment extrait a été inséré dans chacun des plasmides pTn790 et pTn4454. Après la ligation le nouveau plasmide a été électroporé dans des cellules S17 λ pir. Les clones obtenus ont été vérifiés par la présence de résistance au chloramphénicol et surtout par l'intensité de fluorescence émise (décrit plus bas). Lorsqu'on a voulu remplacer la cassette de résistance au chloramphénicol par une de résistance à l'ampicilline, on a remarqué qu'il existait une deuxième cassette *cat* après

la fin du cadre de lecture de la GFPmut3LVA. Il a alors été décidé qu'il était nécessaire d'enlever la cassette *cat* qui se trouvait entre RK6 et RP4. Le plasmide a donc été digéré par *Sac I*, coupant ainsi de chaque côté de ce gène. Le plasmide a été refermé par ligation et électroporé dans des cellules S17 λ pir. Les clones obtenus ont été vérifiés par leur profil de digestion en digérant avec *Sac I* seulement et avec les enzymes *Pvu II* et *Sca I* combinées. Lorsqu'on coupe les plasmides qui possèdent deux cassettes de résistance avec *Pvu II* et *Sca I* combinées, on obtient 5 fragments de différentes tailles. La digestion du plasmide qui possède une seule cassette résulte en 3 fragments seulement. Les clones positifs pour la fluorescence ont été entreposés à -80°C pour effectuer la conjugaison avec les souches *Salmonella* Typhimurium.

3.12 Échange de la queue déstabilisante dans pTn790(et 4454) GFPmut3LVA pour AAV, ASV et LAA

Les autres GFP disponibles au laboratoire ont aussi été insérées dans les plasmides pTn790 et pTn4454. Les cassettes ont été extraites à partir de pJBA113 (GFPASV), pJBA110 (GFPLAA) et pJBA111 (GFPAAV) à l'aide de l'enzyme *Not I*. Les fragments ont par la suite été insérés dans pTn790 et pTn4454 digérés avec *Not I* et les produits de ligations ont été électroporés dans S17 λ pir. Les clones ont été vérifiés par l'intensité de fluorescence (décrit plus bas).

3.13 Construction du plasmide pTnGFPmut3

Le plasmide pTnGFPmut3* a été créé par l'échange des fragments *Nco I* entre les plasmides pBBRIGFPmut3* et pJBA111. Ce fragment *Nco I* correspond à la région terminale de la GFP et la région du promoteur du gène *cat* dans les deux plasmides.

3.14 Mesure de la fluorescence émise par *E. coli* (transformée avec les différents plasmides fluorescents) et par *Salmonella* Typhimurium (GFP insérée dans le génome)

Les plasmides portés par *E. coli* possédant le promoteur *tac* ont été induits en présence d'IPTG à une concentration de 200 μ M pendant 2 heures à 37°C avec aération. Après incubation, les DO₆₀₀ des cultures ont été standardisées à 0.3 et les cellules ont été resuspendues dans 3 mL de PBS 1X et transférées dans des cuvettes à 4 côtés transparents (10 x 10 mm) en acrylique (Sarstedt AG & co., Nümbrecht

Allemagne). L'intensité de fluorescence a été mesurée dans le spectrofluorimètre Cary Eclipse (VARIAN Inc.) à une λ d'excitation de 480nm, la détection de l'émission de la fluorescence s'est fait en balayant des λ entre 500 nm et 550 nm. Pour les souches *Salmonella* Typhimurium, l'étape d'induction a été omise puisque le promoteur *P_{tac}* est constitutif dans cette bactérie, les autres étapes étaient identiques.

4. Résultats et Discussion

4.1. Régulation de la fusion transcriptionnelle chromosomique *PmntH-luc* de *E. coli* par différents inducteurs

4.1.1 Les chélateurs perméables à la membrane induisent une expression beaucoup plus forte du gène *mntH* que les chélateurs non-perméables à la membrane

Dans le présent projet, l'étude de la régulation du gène *mntH* de *E. coli* a été étudiée dans trois souches. Le niveau d'induction du gène en présence de divers chélateurs de métaux divalents, soit perméables (DP et TPEN) ou non-perméables (BPS et DPTA) à la membrane a été mesuré avec la fusion transcriptionnelle *PmntH-luciférase* (Isabelle Bergevin, mémoire de maîtrise 2003).

L'induction de *PmntH-luc* dans EMG2 par différentes concentrations de chélateurs a servi de contrôle positif pour l'induction car cette souche a déjà été caractérisée dans le laboratoire par Isabelle Bergevin (2003). L'induction de *PmntH-luc* s'est effectuée sur des cultures en début de croissance exponentielle pendant 45 minutes, après quoi les lysats ont été effectués et analysés en présence de luciférine. Les valeurs obtenues ont été standardisées selon la DO_{600} de la culture à la fin de l'induction. Les concentrations des chélateurs utilisés étaient 0 μ M, 50 μ M, 200 μ M et 400 μ M.

Le TPEN est utilisé surtout comme chélateur de zinc, cependant il est capable de chélater le manganèse avec une très haute affinité, (Jabado *et al.*, 2000) tandis que le DP possède une très forte affinité pour le fer. (Huang *et al.*, 2002). Le BPS est un chélateur non-perméable à la membrane très spécifique pour les ions Fe^{2+} (fer ferreux) (Alcain *et al.*, 1997 ; Nilsson *et al.*, 2002). Le DPTA est un chélateur ayant une très forte affinité pour le zinc, le fer et le manganèse. Lors des expériences le TPEN était solubilisé dans du sulfoxyde de diméthyl (DMSO), afin d'éliminer une induction possible par le DMSO, des témoins positifs DMSO étaient inclus. Les résultats ne sont pas montrés, mais on a trouvé que le DMSO n'influa pas du tout sur l'expression de *mntH*.

Dans la figure 4A, on remarque une réponse en fonction de la dose et qui est plus marquée avec les deux chélateurs perméables. La réponse au DP atteint un plateau vers 200 μ M, avec une induction 24 fois plus élevée que le niveau de base pour cette concentration et 20 fois plus élevée à 400 μ M. Les trois autres chélateurs continuent à faire augmenter l'expression du gène à 400 μ M. *E. coli* EMG2 ne possède qu'un seul transporteur de manganèse connu, mais plusieurs transporteurs de fer, il est possible

alors qu'ajouter un chélateur de Mn^{2+} à l'intérieur de la cellule provoque une expression de *mntH* supérieure à celle qui pourrait être induite par un fort chélateur de fer. Cependant il est intéressant de voir qu'il y a une régulation appréciable de ce gène par le niveau de fer intracellulaire, puisque le niveau d'induction par le DP est tout de même assez élevé. De la même façon, on observe que l'ajout de chélateurs de métaux divalents non-perméables à la membrane ne provoque pas une induction de *mntH* aussi marquée qu'avec le TPEN. À la concentration la plus élevée essayée, soit 400 μM , on observe une induction 9 fois supérieure à celle du niveau de base pour le DPTA et 16 fois supérieure au niveau de base pour le BPS comparativement à 36 fois plus élevée que le niveau de base pour le TPEN. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les chélateurs perméables captent à l'intérieur de la cellule les ions de fer et manganèse, qui servent de cofacteurs pour les répresseurs du gène *mntH*, MntR et Fur, entraînant ainsi une réponse plus aiguë.

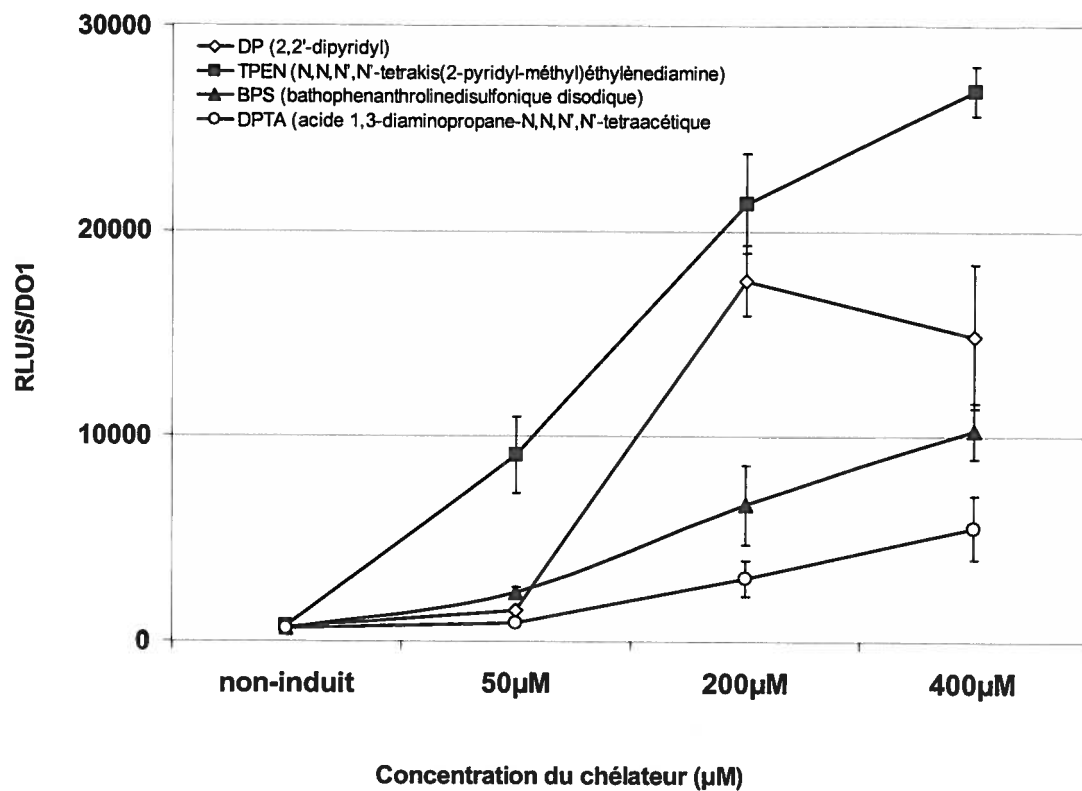
4.1.2 La régulation de l'expression du gène *mntH* est similaire dans la souche uropathogène CFT073 et dans les souches K-12 en présence de chélateurs de fer

La souche *E. coli* CFT073 est un uropathogène isolé d'un patient souffrant d'urosepsis. Cette souche, possède deux transporteurs de manganèse et fer, soit MntH et SitABCD et nous avons un mutant portant la fusion *PmntH-luc* qui a été construit dans le laboratoire par Isabelle Bergevin (non-publié). CFT073 possède aussi des gènes d'acquisition de fer trouvés habituellement chez des pathogènes, tel que *hlyA* (hémolysine) *iutliuc* (aérobactine) et le locus *iroA*, qui code pour le système d'acquisition de fer via des sidérophores appelés salmochélines présents seulement chez *Salmonella* Typhimurium et certains uropathogènes *E. coli*. CFT073 est donc un candidat intéressant afin d'étudier la différence possible dans la régulation du gène *mntH* en présence de chélateurs de métaux divalents. La souche MG1655 est aussi une souche K-12 non pathogène mais différente de EMG2. Contrairement à cette dernière, MG1655 possède le régulateur de transcription Fnr (Perkins *et al.*, 1993), un activateur de gènes impliqués dans le métabolisme anaérobique (Green et Paget, 2004). MG1655 a été comparée à EMG2 au niveau génétique et possède entre autres un patron de restriction différent et un fragment d'environ 600 kb de plus. EMG2 est considérée être la souche la plus proche de la souche sauvage *E. coli* K-12, tandis que MG1655 posséderait des changements survenus lors de la culture en laboratoire (Heath *et al.*, 1992 ; Perkins *et al.*, 1993). Les chélateurs utilisés pour comparer les souches non-pathogènes et la souche pathogène sont le DP (0 μM , 50 μM et 150 μM) et le DPTA (0 μM , 50 μM et 200 μM).

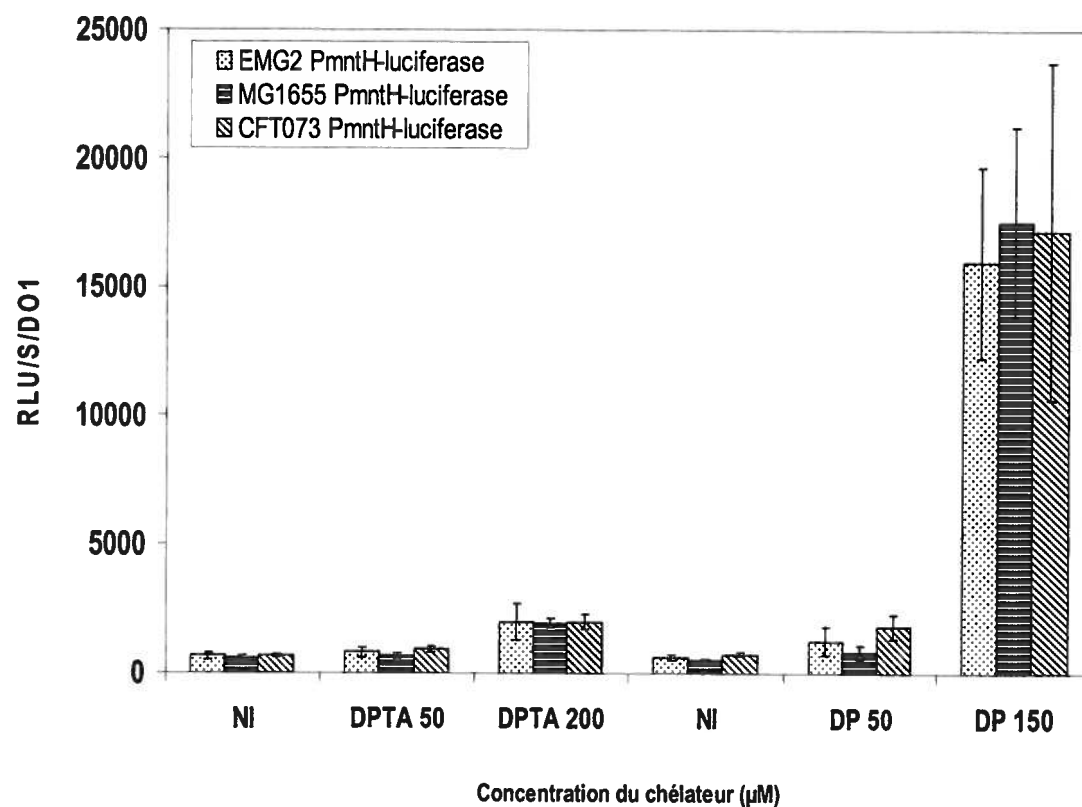
Figure 4. Régulation du gène *mntH* par des chélateurs de métaux divalents.

- A.** Des bactéries non-pathogènes possédant la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* ont été incubées pendant 45 minutes en présence de chélateurs de métaux divalents perméables à la membrane (DP et TPEN) et non-perméables à la membrane (DPTA et BPS). Les écarts-types ont été calculés sur les moyennes de trois expériences indépendantes faites chaque fois en duplicata.
- B.** Des bactéries *E. coli* possédant différents génotypes ont été incubées pendant 45 minutes en présence de chélateurs de métaux divalents perméables à la membrane (DP) et non-perméables à la membrane (DPTA).

A.



B.



On observe dans les trois souches une augmentation similaire de l'activité du gène *mntH* qui dépend de la dose de chélateurs ajoutés (Figure 4B). Pour le DPTA à 50 μ M, on observe une augmentation d'environ 1,1 fois plus élevée que le niveau de base et environ 3 fois plus élevée que le niveau de base à 200 μ M. Le DP, un chélateur perméable à la membrane qui possède une affinité particulière pour le fer (Huang *et al.*, 2002), a aussi été utilisé à 0 μ M, 50 μ M et 150 μ M pour comparer les trois souches. On ne voit qu'une légère augmentation de l'expression du gène à 50 μ M, en moyenne 2 fois plus élevée que le niveau de base pour les trois souches. Par contre à 150 μ M, une augmentation en moyenne de 30 fois plus élevée que le niveau de base est observée pour les trois souches. On confirme ainsi que *mntH* est régulée par les métaux, plus spécifiquement le fer, autant dans des souches pathogènes ou non. Ces résultats sont en accord avec les observations effectuées par Patzer et Hantke (2001) et Isabelle Bergevin (2003) dans notre laboratoire, qui ont trouvé une dé-répression du gène plus marquée en présence de chélateurs perméables à membrane. Ces résultats sont aussi en accord avec des observations effectuées chez *Salmonella* Typhimurium (Ikeda *et al.*, 2005) où l'on a rapporté une régulation de *mntH* par le répresseur Fur.

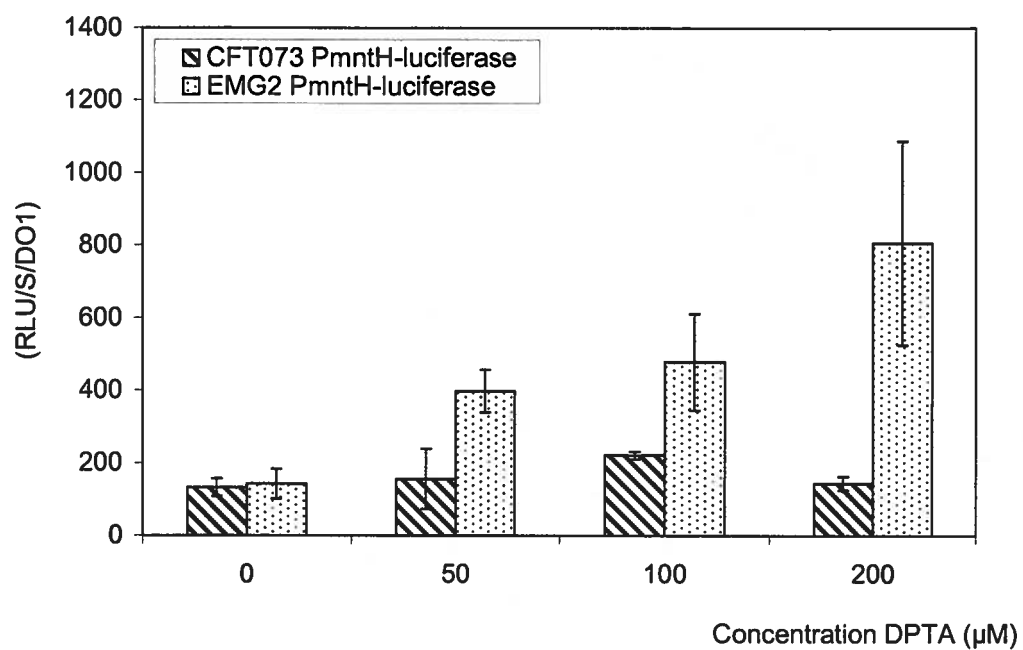
Les souches CFT073 et EMG2 ont aussi été comparées pour la réponse au DPTA pendant 16 heures avec une gamme de concentrations de 0 μ M, 50 μ M, 100 μ M et 200 μ M (Figure 5A). Ce qui a été remarqué alors que l'expression de *mntH* chez CFT073 n'augmente pas de façon dose dépendante pour toutes les concentrations essayées, en moyenne on observe une augmentation de 1,2 fois. Une augmentation qui dépend de la dose est par contre clairement visible dans la souche EMG2, chez qui on observe des augmentations de 2,8 fois, 3,4 fois et 5,7 fois pour 50 μ M, 100 μ M et 200 μ M respectivement. Les niveaux de base à 0 μ M sont du même niveau pour les deux souches.

D'après des analyses de RT-PCR effectuées sur la régulation de *mntH* chez *Salmonella* Typhimurium, il semblerait que ce gène soit induit assez rapidement dans des conditions semblables au milieu phagosomal (Botteldoorn *et al.*, 2005).

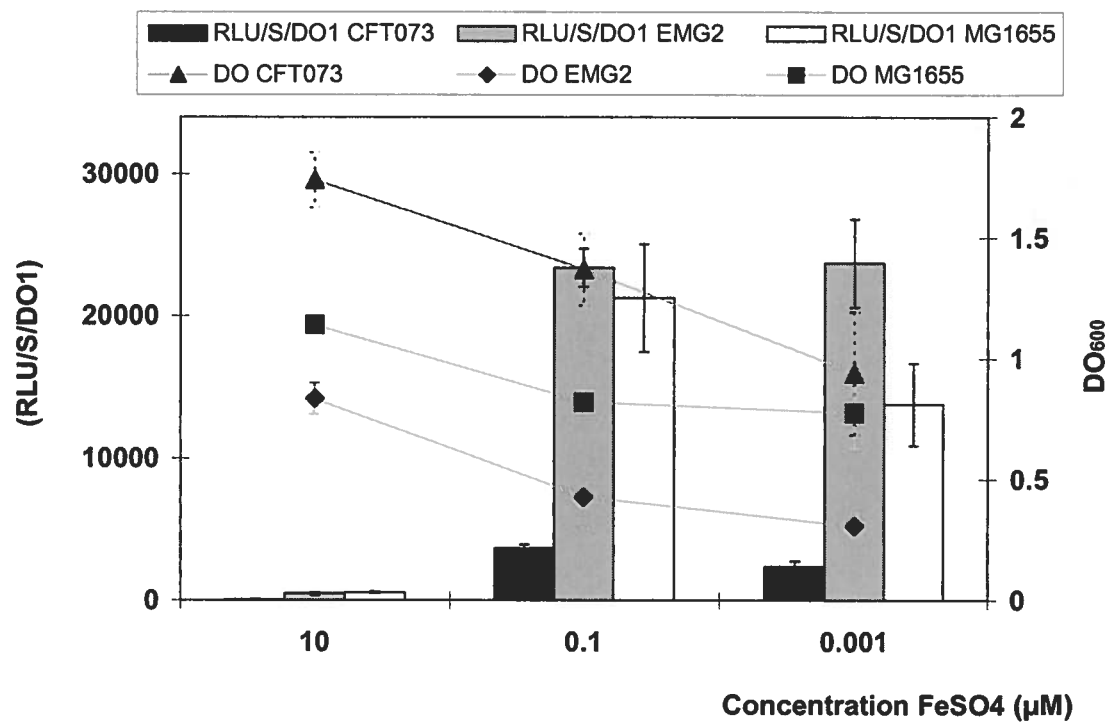
Figure 5. Activité du promoteur du gène *mntH* lorsque la disponibilité de fer est restreinte. Comparaison entre une souche uropathogène et deux souches K-12.

- A. Effet du chélateur non-perméable DPTA sur l'activité du promoteur de *mntH* après incubation de 16 heures. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB contenant différentes concentrations de DPTA. La valeur de la DO_{600} initiale a été standardisée à 0,05 pour toutes les cultures.
- B. Effet de la concentration de Fe^{2+} sur l'activité de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* dans trois souches *E. coli* en milieu minimum. Après incubation de 24 heures en milieu saturé de fer (répression du gène), les bactéries ont été cultivées dans des différentes concentrations de fer pendant 16 heures, après quoi l'activité du promoteur a été mesurée par la luminescence produite.

A.



B.



De plus, une autre étude a rapporté que chez *Salmonella* Typhimurium, on observe une augmentation de l'expression de *sitA* en phase stationnaire mais pas en phase exponentielle (Ikeda *et al.*, 2005). La souche CFT073 possède deux transporteurs de fer et manganèse et plusieurs systèmes d'acquisition de fer (ex. aéro bactéine et salmo chéline) tout comme *Salmonella* Typhimurium, il serait possible alors que l'induction qu'on observe à 45 minutes (Figure 4) mais qui est absente à 16 heures (Figure 5) soit due à l'utilisation préférentielle d'autres transporteurs de métaux.

4.1.3 La régulation de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* en milieu minimum G/M MOPS est différente dans la souche uropathogène CFT073 vs. EMG2 et MG1655

Les expériences avec les chélateurs ont été réalisées dans du milieu LB, qui est un milieu riche. Ce milieu permet une bonne croissance bactérienne, mais sa composition est complexe. La croissance et l'induction du gène *mntH* ont donc été vérifiées en milieu minimum G/M MOPS, ce qui permet de contrôler la concentration des nutriments et des ions. Le milieu minimum a aussi comme caractéristique de mimer le milieu phagosomal, au niveau de la carence des nutriments et permet également de moduler le pH optimal pour la croissance et l'ajout des agents oxydants. Dans le cadre de ce projet, l'effet du manque de fer a été étudié, en allant d'une concentration où le fer est en excès vers des concentrations de plus en plus limitantes. La concentration 10 μM de fer, le point contrôle, est considérée comme saturante et correspond au niveau de base pour ces expériences. À cette concentration le gène *mntH* est complètement réprimé, les autres concentrations utilisées étaient 0,1 μM et 0,001 μM . À la figure 5B, on peut voir que CFT073 a une croissance légèrement plus élevée que EMG2 et MG1655 aux concentrations de 10 μM et 0,1 μM , mais que la différence entre CFT073 et MG1655 semble s'estomper à 0,001 μM . Cependant cette concentration en fer étant très limitante et ce n'est pas surprenant de voir que même un pathogène bien adapté montre un défaut de croissance. À première vue, on aurait tendance à croire que le niveau d'expression de *mntH* augmente beaucoup plus chez les souches K-12 en réponse à la carence en fer. Cependant, lorsqu'on compare le niveau d'expression à 0,1 μM et à 0,001 μM par rapport au niveau de base pour chaque souche on remarque que le niveau d'induction de *mntH* chez EMG2 à 0,1 μM est 50 fois plus élevé, chez MG1655 il est 39 fois plus élevé et que chez CFT073 il est 53 fois plus élevé. L'induction de *mntH* semble atteindre un plateau à cette concentration de fer car on n'observe pas une augmentation supplémentaire à 0,001 μM . Cependant il faut souligner

que CFT073 a un niveau de base d'environ 6,5 fois plus bas que EMG2 et 8 fois plus bas que MG1655. Si on compare cependant le niveau de base après 16 heures de CFT073 dans le milieu LB vs. le milieu minimum 10 μ M Fe, on remarque que le niveau de base de cette souche n'est pas égal dans les deux conditions (Figure 5A vs. 5B). En effet, le niveau de base de CFT073 est égal à EMG2 en milieu riche après 16 heures (Figure 5A). La différence dans le niveau d'expression chez CFT073 dans ces deux conditions serait un aspect intéressant à explorer. Il serait intéressant de déterminer quel élément pourrait être la cause d'une induction plus élevée en milieu LB comparativement au milieu minimum. Est-ce possible que la cause soit liée aux différentes étapes de préparation qui précèdent l'incubation de 16 heures pour chacune des expériences ? Soit exactement 24 heures en milieu G/M 10 μ M Fe (pour la Figure 5B) vs. environ 16 heures en milieu LB (pour la Figure 5A).

Les expériences en milieu minimum se sont déroulées sur un temps de 16 heures, et on sait que du moins dans les expériences qui tentent de reproduire le milieu phagosomal impliquant *S. Typhimurium*, il y a une préférence pour l'utilisation de SitA sur des temps longs (Ikeda *et al.*, 2005) et une préférence pour MntH sur des temps plus courts (Botteldoorn *et al.*, 2005). Il a été observé chez *Salmonella Typhimurium* que *mntH*, qui est régulé par Fur et MntR, est complètement réprimé en présence de fer à 20 μ M même en absence de manganèse. Le gène est cependant exprimé à un niveau au dessus de 60 fois plus élevé à 0 μ M de fer. Un patron très similaire est observé pour la régulation de *sitA*, cependant le niveau d'expression de base est légèrement plus élevé que celui de *mntH* de même que le niveau d'expression à 0 μ M de fer (Ikeda *et al.*, 2005). La présence de *sitABCD* *E. coli* CFT073 sur plasmide est capable de compléter un défaut de croissance chez une souche K-12 déficiente en transport de fer en milieu replet de fer (Sabri *et al.*, 2006). Il est donc possible que dans la souche parentale ce système d'acquisition de métaux divalents couplé aux autres systèmes d'acquisition de fer absents chez les souches non-pathogènes, tel que les salmochélines, permettent à CFT073 d'avoir un niveau d'expression de base plus bas dans certaines conditions saturantes. Ce qui est cependant le plus remarquable est le fait que *mntH*, un transporteur de manganèse, soit si fortement réprimé en présence de fer. En effet, Ikeda *et al.* (2005) ont remarqué que chez *Salmonella Typhimurium*, *mntH* est réprimé par le fer même en absence des deux régulateurs connus, Fur et MntR, ce qui n'était pas le cas pour *sitA*.

4.1.4. Les agents oxydants induisent davantage l'expression du gène *mntH* dans les souches K-12 EMG2 et MG1655 vs. CFT073

Les expériences d'induction de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* par des agents oxydants ont été effectuées sur des cultures en début de phase exponentielle dans du milieu LB. Des cultures fraîches ayant une DO_{600} de 0,6 ont été incubées avec aération en présence de H_2O_2 (100 μM) ou de tBOOH (2 mM) pendant 5 et 15 minutes, après quoi l'activité luciférase a été mesurée.

La figure 6A montre que chez les trois souches, il y a une augmentation de l'expression de *mntH* en présence de peroxyde d'hydrogène, même après 5 minutes. À 5 minutes, il y a une plus grande augmentation dans l'activité du promoteur chez CFT073 (2,1 fois plus élevée que le niveau de base) comparativement à MG1655 (1,2 fois plus élevé), mais semblable à EMG2 (1,8 fois). Le niveau d'activité reste pareil pour la souche pathogène après 15 minutes (1,8 fois), et est plus prononcé chez MG1655 (2,8 fois), mais surtout chez EMG2 (5 fois). Une tendance semblable est observée lors de l'induction avec le tBOOH (Figure 6B); cependant en réponse à cet oxydant on remarque que les deux souches K-12 répondent plus fortement à 5 minutes comparativement à CFT073. Le niveau d'induction de *mntH* continue à augmenter à 15 minutes chez les souches K-12, tandis qu'il atteint un plateau chez CFT073.

Dans l'étude sur la quantification de l'expression de *mntH* (Botteldoorn *et al.*, 2005), des différences ont été observées entre les souches *Salmonella* Typhimurium pour les niveaux d'induction de *mntH* suite à l'incubation avec le peroxyde d'hydrogène. Des résultats légèrement différents ont été obtenus lors de trois différents essais pour une même souche. Nous avons également observé une certaine variabilité lors des expériences effectuées dans le cadre de ce projet. Nous avons vu que les deux souches K-12 et la souche uropathogène n'ont pas le même niveau d'induction de *mntH* en réponse au stress causé par le peroxyde d'hydrogène, mais aussi que d'un essai à l'autre des différences dans les valeurs brutes pouvaient être observées. Les tendances par contre étaient toujours les mêmes, EMG2 montrant un niveau d'expression supérieur à MG1655 en réponse aux oxydants utilisés. Les valeurs rapportées ici proviennent d'une seule expérience faite en triplicata, mais sont représentatives des tendances observées lors d'expériences antérieures. Des études portant sur la régulation de *mntH* par des agents oxydants effectuées chez *Salmonella* Typhimurium (Botteldoorn *et al.*, 2005 ;

Kehres *et al.*, 2002 ; Kehres *et al.*, 2000) s'accordent pour dire que le niveau d'expression de *mntH* est augmenté en présence de peroxyde d'hydrogène.

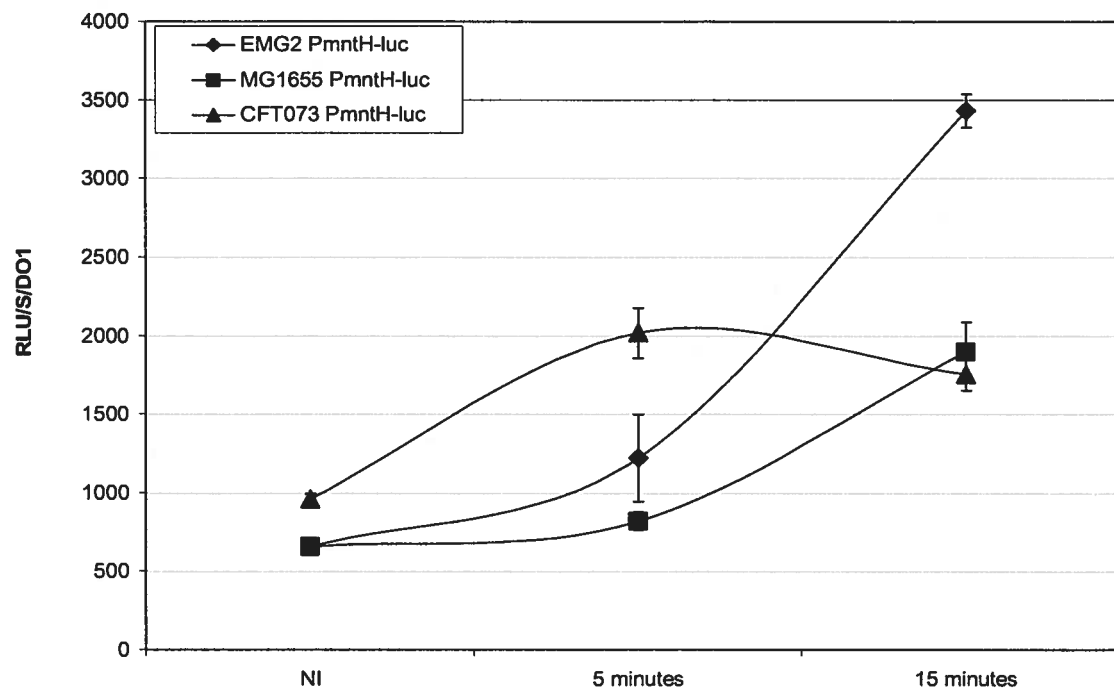
Le promoteur de *mntH* de *Salmonella* Typhimurium possède un site de liaison OxyR, cependant aucun site OxyR n'est présent dans la région du promoteur de *sitABCD*. Par contre Sabri *et al.* (2006) rapportent que la présence de *sitABCD* *E. coli* χ 7122 sur plasmide dans une souche K-12 Δ *mntH*, procure une meilleure résistance au peroxyde d'hydrogène en milieu solide, quoique le mécanisme par lequel SitA apporterait cette protection ne soit pas élucidé. Vu qu'il y a une similarité entre les deux pathogènes *E. coli*, il se pourrait que la différence observée entre la souche CFT073 et les souches K-12 provienne du fait que CFT073 possède *sitABCD* dans son génome. La différence observée entre les deux souches K-12 pour l'induction de *mntH* en présence de deux agents oxydants se trouve seulement au niveau des valeurs obtenues et non au niveau de la tendance générale.

En présence de tBOOH, on a observé chez les deux souches K-12 une légère augmentation de l'expression de *mntH* à 5 minutes suivie d'une augmentation plus prononcée à 15 minutes. Comme c'était le cas avec H_2O_2 , l'induction de *mntH* est plus forte dans EMG2 par rapport à MG1655. Tel qu'il a déjà été mentionné, ces deux souches K-12 sont différentes au niveau génétique, nous avons aussi remarqué un niveau d'expression plus élevé pour EMG2 par rapport à MG1655 lors de l'induction de *mntH* en milieu minimum.

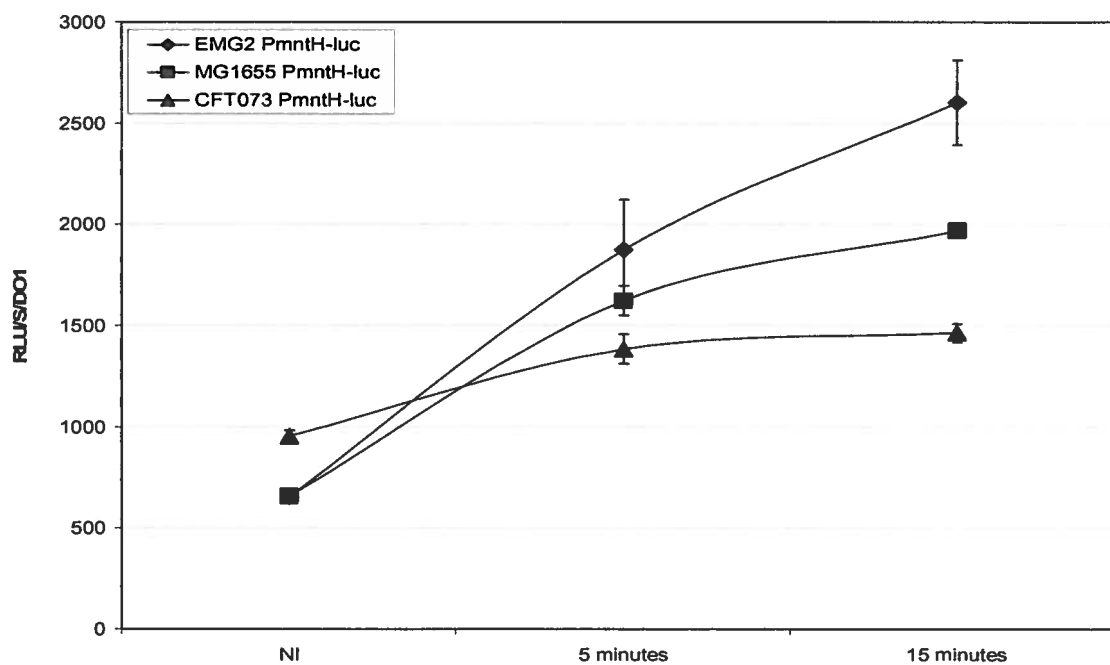
Figure 6. Induction du gène *mntH* par deux agents oxydants. Comparaison entre deux souches non-pathogènes et une souche uropathogène

Des bactéries *E. coli* possédant différents génotypes et portant la fusion intra-chromosomique *PmntH-luc* ont été incubées pendant 5 ou 15 minutes en présence de peroxyde d'hydrogène (A) et tBOOH (B). Un échantillon témoin non-induit a été inclus dans l'expérience autant à 5 minutes qu'à 15 minutes afin de s'assurer un niveau de base uniforme. Les résultats pour l'échantillon non-induit à 15 minutes ne sont pas inclus dans la figure afin de montrer une continuité.

A. H₂O₂



B. tBOOH



4.1.5. La mutation $\Delta oxyR$ n'abolit pas l'induction de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* en présence d'agents oxydants

Afin de vérifier l'influence du régulateur OxyR dans l'induction de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* en présence d'agents oxydants, des doubles mutants *PmntH-luc* $\Delta oxyR$ ont été construits par transduction avec le phage P1. Les mutants obtenus ont été vérifiés par leur niveau de sensibilité à l' H_2O_2 en milieu solide. Afin de vérifier les résultats préliminaires obtenus pour l'induction du gène *mntH* en présence de peroxyde d'hydrogène, le plasmide pPOxyR a été construit et inséré dans les doubles mutants. Les conditions de culture et d'induction ainsi que les agents oxydants étaient identiques à ceux utilisés pour le simple mutant *PmntH-luc*. Isabelle Bergevin (2003) a déjà rapporté des données semblables dans son mémoire de maîtrise, cependant les expériences s'étaient arrêtées avec la création du double mutant *PmntH-luc* $\Delta oxyR$ dans EMG2. Les données préliminaires obtenues lors de son projet nous ont servi à guider la suite des expériences rapportées dans le présent projet. En premier lieu, nous avons décidé de comparer en parallèle l'effet de la double mutation sur l'expression de *PmntH-luc* dans la souche EMG2 et MG1655, par la suite nous avons amplifié le gène *oxyR* incluant la région du promoteur et nous l'avons insérée dans ces doubles mutants sur plasmide à bas nombre de copies. De plus, nous avons étudié un deuxième agent oxydant le tBOOH. Les agents oxydants ont été utilisés à 100 μ M pour le H_2O_2 et à 2mM pour le tBOOH.

La figure 7 montre que l'absence du gène *oxyR* n'élimine pas l'augmentation dans l'activité du promoteur de *mntH* en réponse aux peroxydes. Cette activité est plus basse pour les conditions MG1655/ H_2O_2 (Figure 7A) et EMG2/tBOOH (Figure 7D), et paraît restaurée après réintroduction d'*oxyR* sur plasmide. Il y a une augmentation de l'activité du promoteur de *mntH* chez EMG2 *PmntH* $\Delta oxyR$ (Figure 7C) en présence de H_2O_2 pendant 5 et 15 minutes où l'induction du gène *mntH* est 5 fois supérieure au niveau de base. Tel qu'on peut voir, le double mutant complémenté avec [pPOxyR] montre une activité semblable à celle de *PmntH-luc*.

Les études portant sur l'effet de la mutation $\Delta oxyR$ dans le niveau d'induction de *mntH* en réponse au stress oxydatif ont jusqu'à date été effectuées chez *Salmonella* Typhimurium (Botteldoorn *et al.*, 2005; Kehres *et al.*, 2002). Dans cette espèce, on a remarqué une absence d'induction de *mntH* en réponse au peroxyde d'hydrogène dans les mutants $\Delta oxyR$ (Kehres *et al.*, 2002). Une abolition de l'induction de *mntH* serait

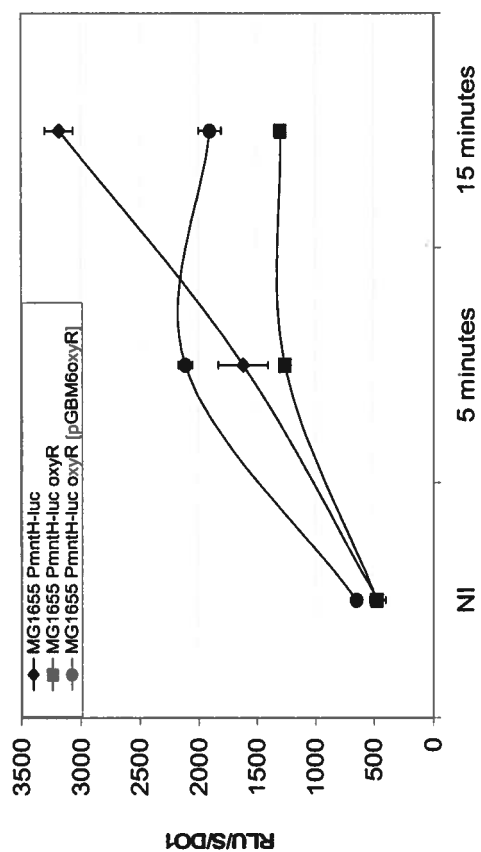
attendue chez *E. coli* suite à l'absence de OxyR, si le gène *mntH* était directement activé par ce régulateur en réponse au peroxyde d'hydrogène. Nos expériences ont été effectuées en milieu LB, donc un milieu soit dit riche en nutriments incluant le fer, sous conditions aérobiques. Les expériences de Kehres et al. (2002) montrant l'abolition de l'induction de *mntH* dans un mutant *oxyR* ont été effectuées en milieu M9 sous des conditions microaérobiques. Il est possible que la différence entre les deux conditions de culture explique la différence entre les résultats.

Le fait que nous voyons une diminution, quoique très légère, dans le niveau de transcription de *mntH*, nous laisse supposer qu'en effet l'absence de OxyR pourrait affecter le niveau de transcription. Cependant, le fait que la transcription ne soit pas complètement abolie nous a permis de supposer que la régulation de *mntH* en réponse au peroxyde d'hydrogène implique d'autres facteurs indépendants de OxyR. Les autres régulateurs connus du gène *mntH* sont Fur et MntR, deux facteurs qui répondent aux concentrations de fer et manganèse respectivement. Quoiqu'il ait été observé que Fur est capable de répondre au Mn et MntR est capable de répondre au Fe. Le gène *fur* fait partie du régulon OxyR et son expression est induite par ce dernier en présence de peroxyde d'hydrogène. Il est bien établi que Fur et le fer sont des régulateurs de *mntH* et des autres systèmes d'acquisition de fer. Puisqu'on sait que le fer libre réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour créer des ions hydroxyles, il serait alors logique d'observer une diminution de l'expression des gènes transportant le fer en réponse à H₂O₂. Alors quelle raison aurait la bactérie d'induire un gène transportant le fer? La réponse est loin d'être simple, puisque MntH est aussi un transporteur de manganèse, un métal connu pour ses propriétés antioxydantes. Chez certaines souches, comme celles qui ont été utilisées dans nos expériences, MntH est le seul transporteur de manganèse connu.

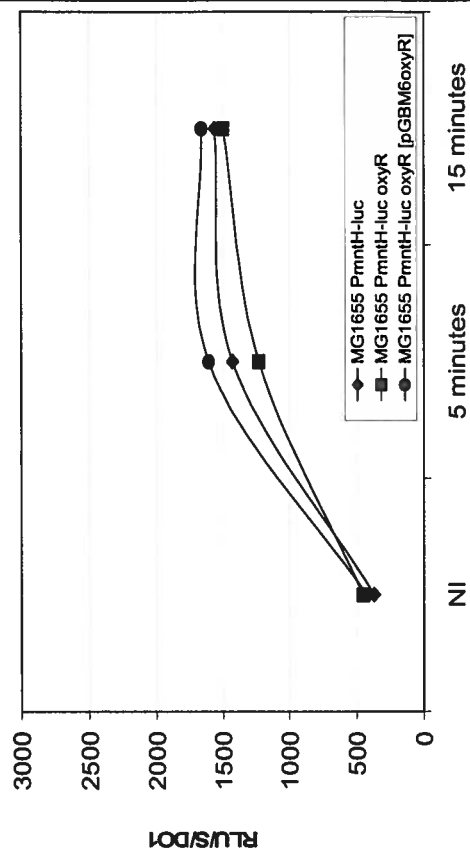
Figure 7. Influence de *oxyR* sur l'induction du gène *mntH* par deux agents oxydants.

Des souches *E. coli* K-12 possédant la fusion intra-chromosomique *PmntH-luc* et la mutation $\Delta oxyR$ ont été incubées en présence de deux agents oxydants, le peroxyde d'hydrogène (A et C) et le tBOOH (B et D). La mutation $\Delta oxyR$ a été complétée en réintroduisant ce gène sous le contrôle de son propre promoteur sur plasmide à bas niveau de copies.

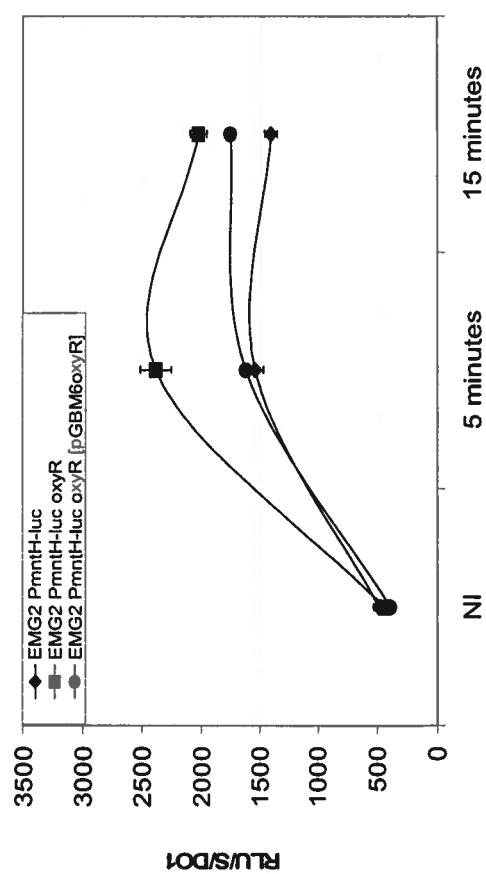
A. H₂O₂



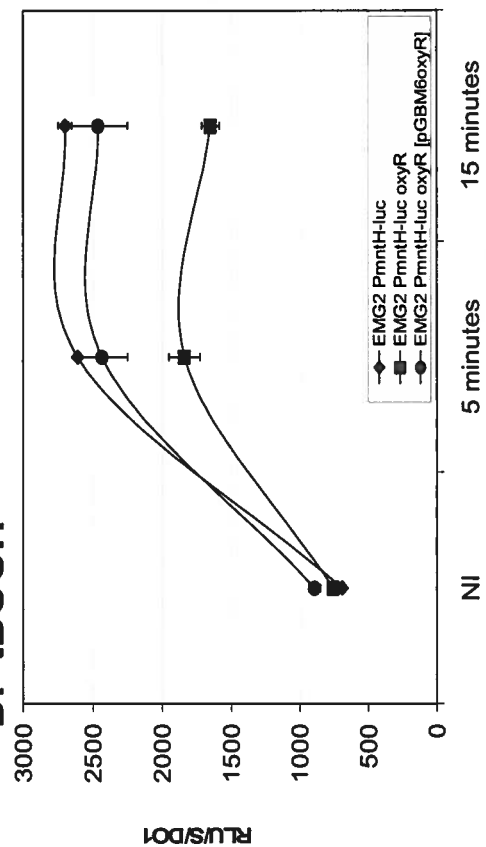
B. tBOOH



C. H₂O₂



D. tBOOH



Suite aux résultats obtenus dans les mutants $\Delta oxyR$, nous avons postulé l'hypothèse suivante: étant donné que dans les conditions de culture que nous avons utilisées, le fer est présent en quantité suffisante pour permettre à Fur d'être liée au promoteur de *mntH*, et vu que Fur forme un dimère possédant deux molécules de Fe^{2+} qui sont des cibles potentielles. Puisque Fur possède plusieurs autres cystéines dont certaines se trouvent exposées à la surface, et que ces groupements sont des cibles à l'oxydation directe par le H_2O_2 , il serait possible que l'oxydation des cystéines module l'activité de Fur et entraîne une dé-répression du gène *mntH*. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons créé des doubles mutants *PmntH-luc* Δfur dans les souches K - 12 EMG2 et MG1655.

4.1.6 La mutation Δfur limite l'induction de la fusion transcriptionnelle *PmntH-luc* en présence d'agents oxydants

Le mutant EMG2 *PmntH-luc* Δfur a déjà été caractérisé dans le laboratoire pour certains aspects, les résultats ont été rapportés dans le mémoire de maîtrise d'Isabelle Bergevin (2003). Ces observations incluent le fait que le mutant *PmntH-luc* Δfur a un niveau d'expression de base plus élevée pour *mntH*, mais que cette dé-répression peut être inversée par la présence de fer ou de manganèse en milieu minimum, laissant supposer que *mntH* est régulé par un autre facteur en présence de fer. Ikeda *et al.*, (2005) ont rapporté que chez un mutant *Salmonella* Typhimurium Δfur , MntR réprime l'expression de *mntH* en présence de fer, quoique à un niveau inférieur à Fur. Une autre observation qui a été rapportée par Isabelle Bergevin est que le mutant EMG2 *PmntH-luc* Δfur a un défaut de croissance significatif en milieu minimum par rapport à *PmntH-luc* et que ce défaut peut être corrigé par l'ajout de manganèse ou la présence de *mntH* sur plasmide. De plus, le DP induit l'expression de *PmntH-luc* indépendamment de celle de Fur. La dernière observation qui a été rapportée est que le double mutant est plus sensible au stress oxydatif dans le test de diffusion sur milieu solide comparé à la souche de type sauvage ou encore des souches avec la simple mutation Δfur ou *mntH*. Une explication possible est que l'absence de *fur* crée une entrée trop élevée de fer et une capacité réduite d'emmagasiner provoquant ainsi une augmentation du stress oxydatif à laquelle la cellule ne peut remédier en absence du transporteur fonctionnel MntH.

Afin de vérifier l'hypothèse émise après les expériences avec les mutants *PmntH-luc* $\Delta oxyR$, nous avons d'abord créé par transduction un double mutant MG1655 *PmntH-*

luc Δfur, le double mutant EMG2 *PmntH-luc Δfur* a été construit par Isabelle Bergevin (2003). De plus nous avons inséré le plasmide pPfur contenant le gène *fur* au complet sous le contrôle de son propre promoteur dans les deux souches. Les oxydants utilisés étaient le H₂O₂ (100 μM) et le tBOOH (2 mM). Les cellules ont été soumises à ces conditions pendant 5 et 15 minutes, après quoi le niveau de transcription de *PmntH-luc* a été analysé.

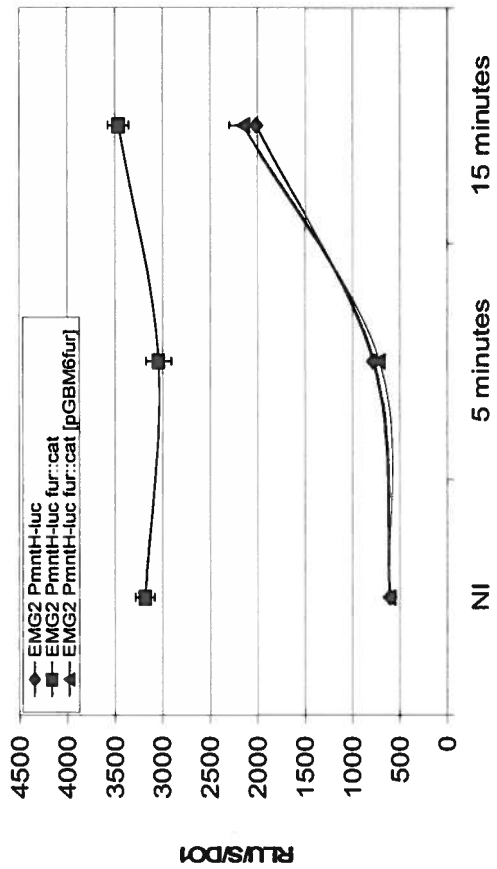
D'après les résultats qui ont été obtenus, Figure 8 (A, B, C, et D) on peut voir qu'en effet les doubles mutants *PmntH-luc Δfur* ont un niveau d'expression de base plus élevé pour le gène *mntH* et qu'un niveau d'expression normal est restitué dans la souche possédant pPfur. Aucun des oxydants testés n'a été capable d'induire une augmentation significative de l'expression du gène *mntH* ni à 5 minutes ni à 15 minutes. La seule condition où on observe une augmentation, mais qui est non-significative est pour le tBOOH à 15 minutes et ce dans les deux doubles mutants. La présence du gène *fur* sur plasmide restitue l'induction du gène *mntH* à un niveau égal au simple mutant *PmntH-luc*.

Ces résultats suggèrent donc que la régulation de *mntH* par les peroxydes pourrait alors être limitée dans un mutant *Δfur* plutôt que dans le mutant *ΔoxyR*, ce qui expliquerait en partie pourquoi nous n'avons pas observé une perte d'induction de *mntH* dans EMG2. Il a déjà été observé que dans des mutants *ΔoxyR*, des gènes sous contrôle direct de *fur* sont exprimés à la hausse et l'explication la plus probable pour cette augmentation de l'expression est que Fur serait inactivée en présence de H₂O₂. Zheng et al. (2001) on rapporté une double régulation de *fhuF* (un gène impliqué dans l'acquisition de fer) par OxyR et Fur. Ce gène est réprimé par Fur en présence de fer intracellulaire, mais il est aussi réprimé par OxyR en présence d'oxydants. Cependant un double mutant *Δfur ΔmntH* est significativement plus sensible que chacun des simples mutants, on s'attendrait alors à une plus forte stimulation de *oxyR* et donc à une plus forte activité de *mntH*, ce qui n'est pas le cas. Selon les résultats que nous avons obtenus, il est impossible de supporter l'idée que *mntH* est régulé par OxyR dans *E. coli*. Une délétion du gène *oxyR* entraîne une augmentation de l'expression en présence de peroxyde d'hydrogène, cependant cette augmentation n'est pas observée chez un mutant *Δfur*. Contrairement à ce qui a été observé pour *fhuF*, *mntH* est induit par le peroxyde d'hydrogène dans une souche *oxyR+* et *fur+*. Cependant comme pour *fhuF*, la régulation de *mntH* par le peroxyde d'hydrogène est perdue dans un mutant *Δfur*. L'explication donnée par Zheng et al. (2001) est qu'en absence de OxyR, le peroxyde d'hydrogène inactiverait

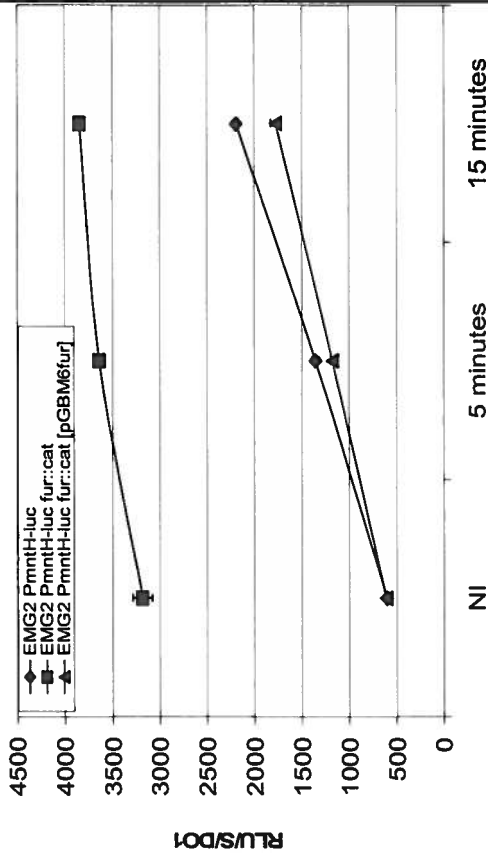
Figure 8. Induction du gène *mntH* par deux agents oxydants dans un double mutant *PmntH-luc* Δfur .

Des souches différentes *E. coli* K-12 possédant la fusion intra-chromosomique *PmntH-luc* et la mutation Δfur ont été incubées en présence de deux agents oxydants, le peroxyde d'hydrogène (A et C) et le tert-butyl hydroperoxyde (B et D). La mutation Δfur a été complétée par la présence de ce gène sous le contrôle de son propre promoteur sur plasmide à bas niveau de copies.

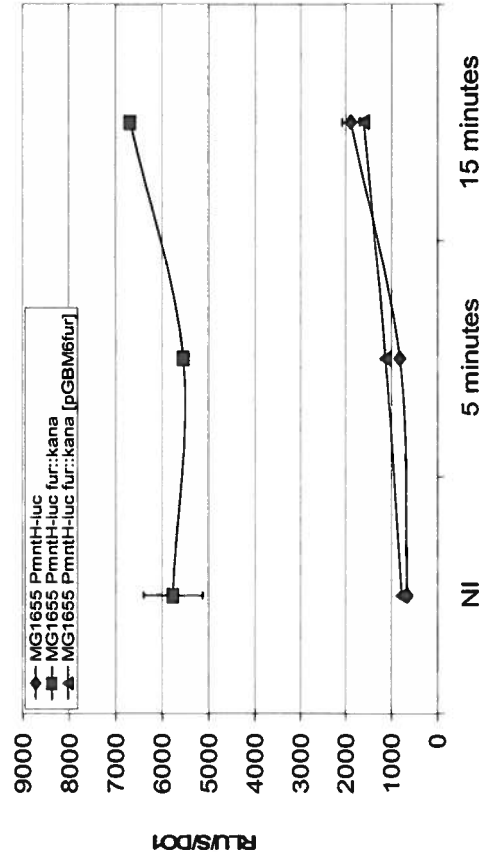
A. H₂O₂



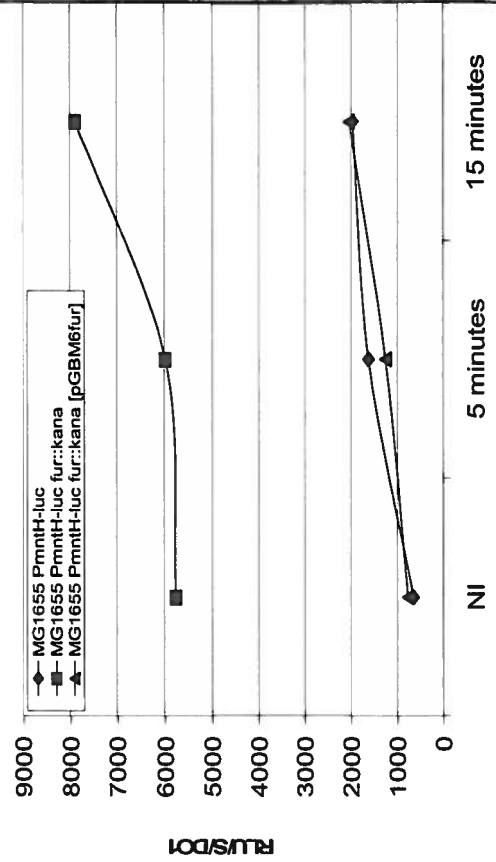
B. tBOOH



C. H₂O₂



D. tBOOH



effet inactiver le complexe Fe-Fur *in vivo* et *in vitro* par liaison directe avec le Fe^{2+} . Un membre de la superfamille Fur, identifié chez *B. subtilis* et qui joue un rôle dans la réponse au stress oxydatif est PerR. Ce régulateur forme un dimère et tout comme Fur, possède deux atomes de fer par sous-unité. Lee et Helmann (2006) ont observé que PerR doit son activité dans la transcription des gènes en réponse au stress oxydatif à la réaction directe entre le H_2O_2 et 2 résidus d'histidine. Les résultats obtenus par d'autres équipes et nos propres résultats nous permettent de dire que notre hypothèse est du moins plausible puisque la régulation de *mntH* par Fur augmente la sensibilité à H_2O_2 dans le double mutant $\Delta mntH \Delta fur$. Une caractérisation plus poussée de ce phénotype serait nécessaire afin de finaliser la vérification de notre hypothèse de départ. Les mutations Δfur et $\Delta oxyR$ ont été introduites seulement dans les deux souches K-12, et en se basant sur ce qu'on a observé chez la souche CFT073, soit une régulation du promoteur *mntH* différente aux souches K-12 en présence d'agents oxydants, il serait intéressant de vérifier quel phénotype résulte dans la mutation de ces deux régulateurs chez ce pathogène.

4.2 Tests de diffusion sur milieu solide

4.2.1 La mutation $\Delta oxyR$ crée une hypersensibilité aux oxydants dans la souche EMG2 mais pas dans la souche MG1655

Nous avons recherché un effet cumulatif possible des mutations $\Delta mntH$ et $\Delta oxyR$ dans les souches EMG2 et MG1655, la mutation $\Delta oxyR$ a été transduite à partir de la souche QC2398 (gracieuseté D. Touati) dans les souches *PmntH-luc*. Afin d'établir l'effet de la mutation $\Delta oxyR$ sur la sensibilité aux agents oxydants, nous avons effectué des tests de diffusion sur milieu solide. Le H_2O_2 et le tBOOH ont été utilisés à des concentrations différentes pour les différentes souches, car il a été remarqué lors du criblage des transductants EMG2 que ces derniers étaient beaucoup trop sensibles aux concentrations nécessaires pour mesurer une réponse dans les souches de type sauvage et le simple mutant $\Delta mntH$ ou $\Delta oxyR$. La souche QC2398 a été incluse comme contrôle positif dans toutes les expériences.

Le tableau 4 montre les résultats obtenus pour ces expériences. Tel qu'attendu, le mutant $\Delta oxyR$ montre une sensibilité plus élevée au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage. La souche EMG2 type sauvage est légèrement plus sensible au stress oxydatif induit par le H_2O_2 que MG1655 type sauvage. La sensibilité n'augmente pas chez EMG2 *PmntH-luc* en réponse au H_2O_2 mais elle augmente de façon significative en réponse au

tBOOH. L'introduction d'une mutation $\Delta oxyR$ dans EMG2, la rend hypersensible au stress oxydatif, la combinaison des mutations *PmntH-luc* $\Delta oxyR$ ne semble pas augmenter cette hypersensibilité en réponse au peroxyde d'hydrogène, mais elle augmente en réponse au tBOOH. Afin de mesurer l'efficacité de la complémentation de $\Delta oxyR$ sur plasmide, nous avons comparé la croissance des mutants en présence de H_2O_2 (3,04%), une concentration 10 fois inférieure à celle qui a été utilisée pour comparer le simple mutant *PmntH-luc* au type sauvage. À cette concentration, on observe que la combinaison des mutations *PmntH-luc* et $\Delta oxyR$ n'est pas additive et que la présence de *oxyR* restore la sensibilité des mutants au niveau du type sauvage même dans le double mutant.

La souche MG1655 a montré une sensibilité moins prononcée aux agents oxydants, dans le sens où il a été possible de prendre des mesures suite à l'incubation en présence de H_2O_2 30,4% même dans les mutants $\Delta oxyR$. Dans cette souche, une différence a été remarquée au niveau de la sensibilité entre le simple mutant $\Delta oxyR$ et le double mutant *PmntH-luc* $\Delta oxyR$. Contrairement à ce que nous avons vu pour EMG2, chez MG1655 on observe un effet cumulatif des deux mutations, cependant la taille de la zone d'inhibition n'est pas la somme obtenue par les deux mutations individuellement en présence de H_2O_2 . Ce qui suggère que le gène *mntH* n'est pas seulement sous le contrôle de *OxyR*.

Tableau 4. Sensibilité de différents mutants *E. coli* K-12 $\Delta oxyR$ au peroxyde d'hydrogène et au tert-butyl hydroperoxyde.

Nom du mutant	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) H_2O_2	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) tBOOH
QC2398 ($\Delta oxyR$)	50.9 (± 2.7)	59.8 (± 2.4)
CFT073 <i>PmntH-luc</i>	34.5 (± 0.7)	45.5 (± 0.7)
EMG2 WT	33.0 (± 0.5)	35.5 (± 2.0)
EMG2 <i>PmntH-luc</i>	33.9 (± 0.6)	38.9 (± 1.6) *
EMG2 $\Delta oxyR$ †	37.0 (± 0.8)	37.8 (± 2.2)
EMG2 <i>PmntH-luc</i> $\Delta oxyR$ †	34.3 (± 1.5)	41.5 (± 0.6) *
MG1655 WT	31.5 (± 0.6)	36.0 (± 0.8)
MG1655 <i>PmntH-luc</i>	34.3 (± 1.0)	40.3 (± 0.5) **
MG1655 $\Delta oxyR$	56.8 (± 2.2) **	66.6 (± 5.7) **
MG1655 <i>PmntH-luc</i> $\Delta oxyR$	68.3 (± 2.9) **	Aucune croissance
EMG2 WT †	22.0 (± 0.0)	
EMG2 $\Delta oxyR$ †	43.5 (± 0.7) **	
EMG2 <i>PmntH-luc</i> $\Delta oxyR$ †	44.5 (± 0.7) **	
EMG2 $\Delta oxyR$ [pPoxR] †	20.5 (± 0.7) **	
EMG2 <i>PmntH-luc</i> $\Delta oxyR$ [pPoxR] †	20.8 (± 0.5) **	

† : H_2O_2 3.04%, les résultats pour le type sauvage, le simple mutant $\Delta oxyR$ et le double mutant *PmntH-luc* $\Delta oxyR$, sont des moyennes faites à partir des échantillons en duplicata. Les résultats des mutants complémentés sont des moyennes obtenues à partir d'échantillons en quadruplicata.

‡ : H_2O_2 0.3%, tBOOH 0.0625M, les résultats sont des moyennes à partir d'échantillons en triplicata.

Les autres essais ont été effectués avec H_2O_2 30,4% et tBOOH 0,5M

* : valeurs statistiquement significatives à $p < 0.05$

** : valeurs statistiquement significatives à $p < 0.01$

4.3 Recherche de conditions optimales pour le test de sensibilité à la gentamicine

Tel qu'il a déjà été mentionné, *Salmonella* Typhimurium possède deux transporteurs de fer et de manganèse ainsi qu'une grande diversité de transporteurs spécialisés dans l'acquisition de fer (Fe^{2+}). Élise Boyer (2002) a introduit des mutations simples ou en combinaison dans *mntH*, *sitA*, *tonB*, *feoB* et *entB* dans *Salmonella* Typhimurium (isolat clinique Keller). Des résultats publiés en 2002, (Boyer *et al.*, 2002) ont démontré qu'un double mutant $\Delta mntH \Delta sitA$ de ce pathogène intracellulaire devient

sensible au peroxyde d'hydrogène et au 2,2'-dipyridyl et possède une capacité réduite pour l'acquisition de manganèse. Le triple mutant $\Delta mntH \Delta sitA \Delta feoB$ a un retard de croissance en milieu minimum qui peut être corrigé par l'ajout de fer dans le milieu, mais non par l'ajout de manganèse. La virulence de certains mutants dans les souris *Nramp1*^{-/-} est atténuée notamment chez les mutants $\Delta feoB$ et $\Delta sitA$. La réplication dans les cellules RAW264.7 n'est atténuée que pour les mutants ayant une mutation $\Delta sitA$ simple ou en combinaison avec *mntH*.

Il a été décidé de continuer la caractérisation des transporteurs de fer et manganèse dans ce pathogène. Deux étapes ont été franchies lors de mon projet de maîtrise, la première est une mise au point du protocole utilisée pour l'essai de sensibilité à la gentamicine (Boyer *et al.*, 2002), qui sert à mesurer la réplication intracellulaire dans les macrophages RAW264.7. La deuxième étape a été d'insérer le gène de la protéine GFP dans le génome de *Salmonella* Typhimurium pour servir de rapporteur *in vivo*.

Le tableau 5 montre les paramètres qui ont été mis au point en les comparant à ceux qui ont été utilisés dans Boyer *et al.* (2002). Les modifications portées à ce protocole sont basées sur des exemples donnés dans Current protocols in immunology. Pour tous les paramètres changés plusieurs conditions ont été essayées avant de trouver la valeur optimale.

Les nouveaux paramètres ont été utilisés dans les expériences sur la complémentation des doubles mutants M2S par différents homologues *mntH* rapportées par Frédéric Veyrier (Veyrier *et al.*, 2004).

Tableau 5. Comparaison entre les paramètres qui influencent les résultats lors des tests de sensibilité à la gentamicine.

Paramètre	Boyer <i>et al.</i> , 2002	Présente étude
MOI (bactérie : macrophage)	1 :10 (Nramp1 ^{+/+}) 1 :100 (Nramp1 ^{-/-})	1:1 (Nramp1 ^{+/+}) 1 :10 (Nramp1 ^{-/-})
% de confluence des cellules	5 x 10 ⁵ cellules/puits (plaque de 24 puits)	5 x 10 ⁵ cellules/puits (plaque de 24 puits)
Phase de croissance bactérienne	Stationnaire, incubation sans aération	Stationnaire, incubation sans aération
Centrifugation pour adhérer les bactéries	Ø	350 x g, 5 minutes, 4°C
Temps d'incubation pour l'internalisation des bactéries	2 heures	20 minutes
Nombre et intensité des lavages	2 lavages PBS 1X froid	2 lavages PBS 1X température ambiante
Concentration de Gm	100 µg/mL initiale 10 µg/mL pendant la répllication	100 µg/mL initiale 10µg/mL pendant la répllication
Durée de l'infection	4 heures	9 heures

4.4 Fluorescence des GFP produites par les plasmides pP_{tac}GFPmut3LVA et pJBA111LC

Le but d'exprimer une protéine fluorescente chez *Salmonella* Typhimurium est de permettre une quantification plus rapide lors des tests de résistance à la gentamicine et *in vivo*.

Le plasmide pP_{tac}GFPmut3LVA a été construit en échangeant les régions codant pour le promoteur entre pP_{pagC}GFPmut3LVA et pP_{tac}GFPmut2OVA. La figure 9A montre des clones résultant de ces clonages qui étaient négatifs pour la fluorescence, pourtant ils étaient positifs lorsque vérifiés par profil de restriction. Les clonages ont été essayés plusieurs fois, mais chaque fois des clones positifs par profil de restriction ne montraient

aucune fluorescence. Le contrôle négatif utilisé était *E. coli* DH1 sans plasmide, il se confond avec les clones qui ont été criblés.

Une deuxième stratégie a alors été planifiée : changer l'origine de réplication du plasmide pJBA111 (500 copies par cellule) pour l'origine de réplication de pP_{tac}GFPmut2OVA (environ 20 copies par cellule). L'amplification des deux fragments a été effectuée par PCR et les clones obtenus ont été vérifiés par profil de restriction. Parmi les clones positifs au profil de restriction, un seul clone a émis de la fluorescence détectable. Un total de 144 clones positifs au profil de restriction ont été testés pour l'émission de fluorescence, la figure 9B montre les résultats du premier criblage impliquant 24 clones. Le contrôle négatif ainsi que les autres 23 clones ne sont pas visibles, mais on peut très clairement voir le clone numéro 24 qui a été le seul à émettre de la fluorescence. Ce plasmide a été introduit par électroporation dans *Salmonella* Typhimurium WT et MS, ces souches ont aussi émis assez de fluorescence quantifiable. Des tests de croissance ont été effectués afin de vérifier si la présence de la GFP nuisait pour les bactéries et nous avons remarqué que les bactéries avaient tendance à éliminer le plasmide aussitôt la pression de sélection enlevée. Nous avons alors décidé d'insérer une copie unique du gène de la GFP dans le génome des bactéries afin de contourner ce dernier problème.

4.5 Fluorescence de la GFPASV insérée en copie unique dans le génome de *Salmonella* Typhimurium

Le plasmide pTnGFPmut3LVA a été construit en clonant le fragment Not I de pJBA111 dans le site *Not* I de pTn790 et pTn4454. Les clones obtenus ont été vérifiés par profil de restriction mais aussi par l'émission de fluorescence. Un clone positif a été utilisé pour effectuer la conjugaison avec *Salmonella* Typhimurium WT et M2S, les exconjugants ont été criblés par l'acquisition de la résistance au chloramphénicol et sur bismuth agar. La souche M2S a été utilisée au lieu de la souche MS car les plasmides pJBA111 et pJBA113 contiennent le gène *cat* à la fin de la séquence codant pour la GFP.

Quoique la fluorescence fût émise par le plasmide multi-copies pTnGFPmut3LVA dans *E. coli* S17λpir, aucun des exconjugants *Salmonella* Typhimurium n'a émis de la fluorescence. Il a alors été décidé de cloner le fragment NotI de pJBA113 qui correspond au gène de la GFPmut3ASV, une GFP ayant une stabilité supérieure à la GFPmut3LVA. Les clones obtenus ont été criblés par l'émission de la fluorescence et profil de restriction, un des clones a été choisi pour effectuer la conjugaison avec *S. Typhimurium* WT et M2S.

Les exconjugants ont été criblés par l'acquisition de la résistance au chloramphénicol et par la croissance sur milieu bismuth agar.

La fluorescence des mutants *Salmonella* Typhimurium WT et M2S STM790 :: GFPASV et STM4454 :: GFPASV a été mesurée (Figure 10A). Tel qu'on peut observer, la quantité de fluorescence émise est du même ordre que l'intensité du plasmide pJBA111LC. Afin de vérifier l'effet de la GFP sur la croissance, les souches ont été incubées pendant 4 ou 16 heures, les DO_{600} initiales ont été standardisées à 0,05. Les figures 10B et 10C montrent les courbes de croissance en milieu LB des souches WT et M2S GFPASV comparées avec les souches n'exprimant pas la GFPASV. L'expression de la GFPASV ne semble pas nuire à la croissance en milieu riche (Figure 10B), et ce indépendamment du pseudogène dans lequel la construction a été insérée.

Les vérifications dans le spectrofluorimètre sont toujours faites en standardisant la DO_{600} à 0,3, cependant des données préliminaires (non-montrées) démontrent que l'intensité de la fluorescence varie avec la DO_{600} . Afin d'être en mesure d'utiliser ce nouvel outil dans la quantification de la réplication intracellulaire, il faudra corrélérer l'intensité de la fluorescence émise avec les CFU que cette intensité représente.

Les plasmides pTnGFPmut3LAA, pTnGFPmut3AAV et pTnGFPmut3* ont aussi été construits, cependant ils n'ont pas été insérés dans *Salmonella* Typhimurium. Ils ont été vérifiés pour l'émission de fluorescence dans *E. coli* et l'intensité de fluorescence émise concorde bien avec le degré de stabilité de la protéine. Chaque mutation induite à la séquence terminale du gène de la GFP correspond à une stabilité différente, la GFPmut3* étant la plus stable, suivi de la GFPASV puis de la GFPAAV et enfin de la GFPLAA et GFPLVA. Tous ces fluorochromes sont prêts à être introduits dans *Salmonella* Typhimurium, ou dans une autre bactérie après le remplacement des pseudogènes de *Salmonella* Typhimurium par des fragments génétiques spécifiques à l'espèce.

Figure 9. Fluorescence des clones pP_{tac}GFPmut3LVA et pJBA111LC

Les mesures ont été prises après 2 heures d'induction avec 200 μ M d'IPTG. Les DO₆₀₀ des cultures ont été standardisées à 0,3 et les cellules ont été resuspendues dans du PBS1X. Le témoin négatif utilisé est *E. coli* DH1 sans plasmide.

- A. Plasmide pP_{tac}GFPmut3LVA exprimé dans *E. coli* DH1. Criblage de clones tous positifs au profil de restriction mais n'émettant pas de fluorescence.
- B. Plasmide pJBA111LC exprimé dans *E. coli* DH1. Criblage de clones tous positifs au profil de restriction, un seul clone était positif pour l'émission de fluorescence.

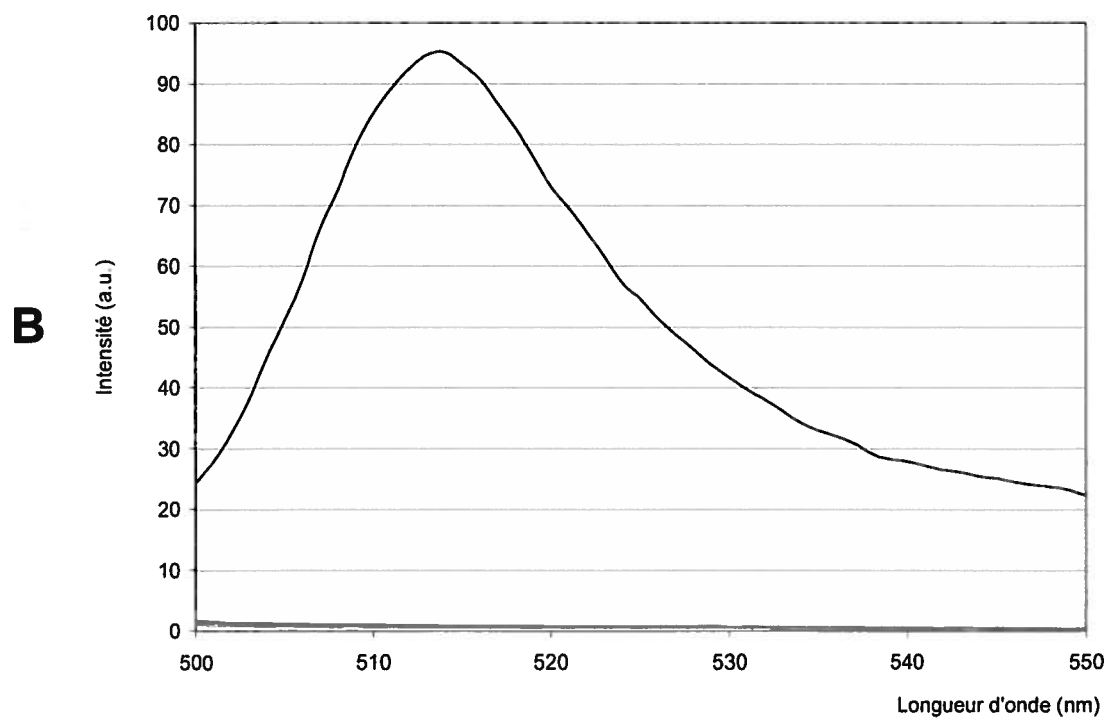
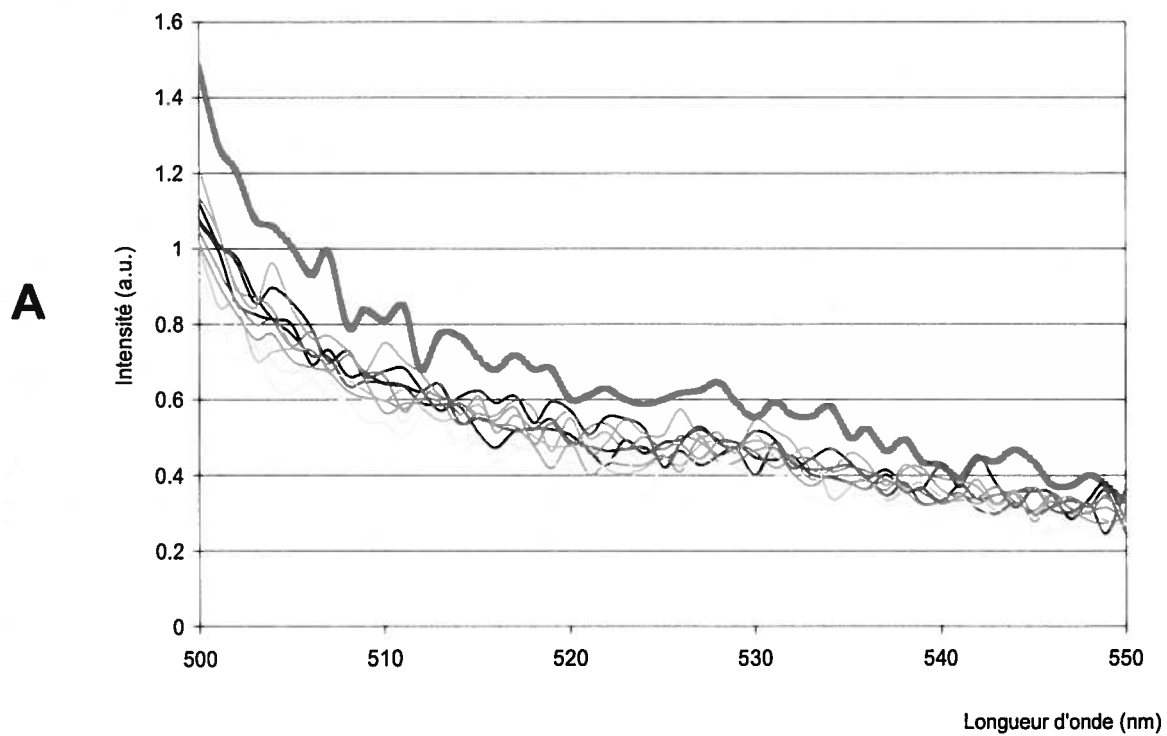
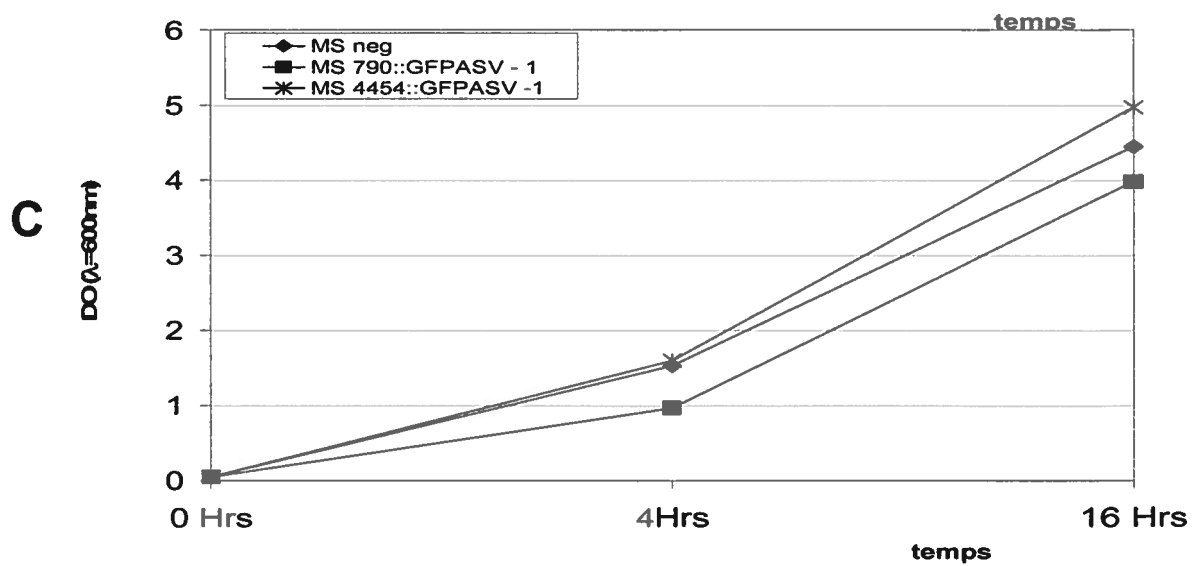
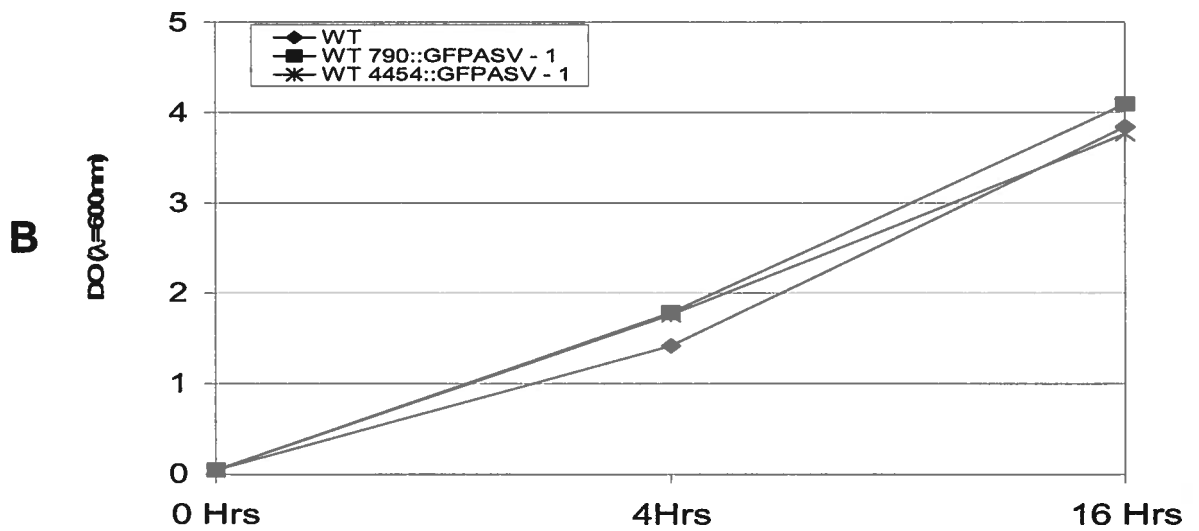
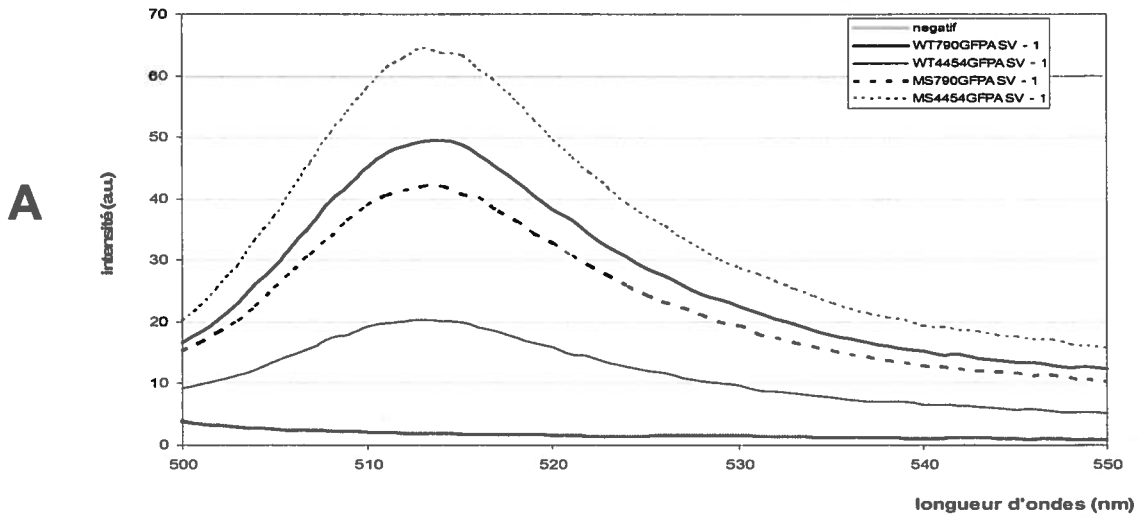


Figure 10. Intensité de fluorescence obtenue avec P_{tac} GFP insérée dans le génome de *Salmonella* Typhimurium et effet de l'expression de la fusion intra-chromosomique STM790 :: GFPASV et STM4454 :: GFPASV sur la croissance chez *Salmonella* Typhimurium

- A.** Des souches *Salmonella* Typhimurium de type sauvage et du mutant M2S ont été transformées par conjugaison afin d'insérer la GFPASV sous le contrôle du promoteur P_{tac} dans deux pseudogènes différents (STM790 et STM4454). La fluorescence a été mesurée par excitation avec une longueur d'onde de 480nm et mesurée sur une gamme de longueur d'ondes allant de 500nm à 550nm.
- B et C.** Des bactéries *Salmonella* Typhimurium portant la fusion intra-chromosomique ont été incubées pendant 4 et 16 heures à 37°C, la densité optique ($\lambda=600nm$) initiale a été réglée à 0,05 pour tous les échantillons.



5. Conclusions

Les expériences présentées dans le cadre de ce projet ont permis de poursuivre la caractérisation de *mntH* de *E. coli*. Les expériences ont été effectuées dans trois souches, dont une est pathogène. Des différences dans la régulation de *mntH* ont été remarquées dans la souche pathogène en présence d'agents oxydants mais aussi dans des conditions limitantes en fer. La souche uropathogène testée possède un deuxième transporteur de métaux divalents, un homologue du système *sitABCD* de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ainsi que d'autres transporteurs de fer qui ont été identifiés seulement chez des pathogènes très virulents (salmochélines, aérobactine). D'après nos données et ce qui a été observé préalablement chez *Salmonella* Typhimurium, la régulation de *mntH* est contrôlée par les métaux divalents (Fe, Mn) et par certains agents oxydants (ex. H₂O₂). Le niveau d'induction de *mntH* par ces facteurs dépend de l'espèce, de la souche, du milieu dans lequel la bactérie est cultivée ainsi que la phase de croissance. Le gène *mntH* est le plus fortement induit en présence de chélateurs de fer perméables à la membrane, ce qui est dû sûrement à la chélation des cofacteurs nécessaires pour les métallos-répresseurs Fur et MntR. Les chélateurs non-perméables utilisés à des concentrations similaires induisent la transcription de *mntH* à un niveau moins élevé, car ils sont moins efficaces pour moduler le taux de fer à l'intérieur des bactéries et peut-être dû à la capacité des sidérophores de compenser la baisse des micronutriments accessibles. La comparaison entre une souche K-12 et la souche uropathogène CFT073 cultivées en présence de DPTA pendant 16 heures, nous a permis d'observer que dans cette dernière le gène *mntH* était relativement peu exprimé, ce qui suggère que cette souche est mieux adaptée aux chélateurs externes. L'hôte répond à l'infection en séquestrant le fer et plusieurs autres nutriments de base, et certains pathogènes identifient la carence en fer en tant que signal pour augmenter l'expression des facteurs de virulence. La souche CFT073 a un taux d'expression de *mntH* plus faible que les souches K-12 et même lors de la carence sévère en fer, le taux d'expression détecté chez CFT073 est bien en dessous de ce qui est mesuré dans les souches K-12. Afin de continuer la caractérisation dans ce pathogène la construction des souches portant des mutations $\Delta sitA$ ou $\Delta tonB$ a été entamée. Leur caractérisation serait importante afin de déterminer l'influence de SitA, un deuxième transporteur de Mn, et les différents sidérophores propres aux souches pathogènes tel que l'aérobactine et les salmochélines.

D'autres résultats obtenus lors de ce projet nous ont permis de démontrer encore une fois l'importance du fer et du manganèse non seulement dans la physiologie des

bactéries non-pathogènes, mais aussi dans la virulence des bactéries pathogènes. Les pathogènes possèdent une meilleure adaptation au manque de micronutriments dans le milieu, tel qu'observé dans les expériences en milieu minimum, où on a montré que le pathogène CFT073 était moins affecté que les souches K-12 par le manque de fer. En effet, la croissance de ce pathogène est moins affectée et le niveau d'expression de *mntH* est de loin le plus bas. L'induction de *mntH* en réponse au peroxyde d'hydrogène est plus rapide, mais n'augmente pas avec le temps chez un pathogène comme CFT073, tandis que les souches K-12 répondent plus lentement et atteignent un niveau d'expression plus haut. Ce qui suggère que le pathogène serait plus apte à s'adapter à ce type de stress.

Le rôle potentiel de différents facteurs de transcription, en réponse au stress oxydatif a été étudié. Chez les mutants K-12 *PmntH-luc ΔoxyR*, le gène *mntH* est exprimé à un niveau similaire aux souches *oxyR+*, ce qui indique que l'induction de *mntH* en présence d'oxydants implique d'autres facteurs. Des mutants *ΔoxyR* sont plus sensibles en test de diffusion sur milieu solide et la combinaison des mutations *PmntH-luc* et *ΔoxyR* augmente cette sensibilité dans la souche MG1655. L'hypersensibilité du mutant *ΔoxyR* EMG2 empêche de vérifier ce résultat car il est impossible d'effectuer les tests aux mêmes concentrations d'oxydants dans les deux souches. Les données recueillies indiquent qu'un ou des facteurs dépendants de OxyR est/sont requis pour réguler *mntH* en réponse aux peroxydes.

Le rôle du répresseur Fur a été étudié en combinant les mutations *PmntH-luc* et *Δfur*. Le niveau d'expression de base de *mntH* dans ce double mutant est plus élevé et il a été impossible de détecter une induction de *mntH*. Les agents oxydants testés ont relativement peu modulé le taux d'expression basale de *mntH* et l'absence du répresseur Fur ne correspond pas à une induction de *mntH* qui est toutefois possible en présence de chélateurs de métaux divalents (Isabelle Bergevin, 2003). Une possibilité serait que Fur soit directement inactivé en présence de peroxydes suite à la réaction avec atomes de fer portés par cette protéine. Un mécanisme d'action semblable a été décrit pour une protéine appartenant à la même famille que Fur, PerR (une protéine spécialisée dans la détection d'oxydants), et d'ailleurs il a déjà été observé que Fur réagit directement avec le peroxyde d'hydrogène et devient inactivé par ce dernier *in vitro*.

La caractérisation de certaines souches de *S. Typhimurium* portant des mutations au niveau des gènes impliqués dans l'acquisition de fer et de manganèse a déjà été

entamée au laboratoire. Dans le cadre de ce projet le protocole de test de sensibilité à la gentamicine a été optimisé afin d'améliorer des paramètres susceptibles d'augmenter la variabilité dans les expériences et faciliter l'étape de quantification de la réplication intracellulaire. Le gène de la GFP a été inséré dans deux pseudogènes de *S. Typhimurium*, et l'intensité de fluorescence observée est assez élevée pour potentiellement permettre de suivre la réplication intracellulaire de ce pathogène. D'autres plasmides suicides contenant des GFP ayant différentes durées de demi-vie ont aussi été construits et sont prêts à être utilisés.

6. Bibliographie

- ALCAIN F.J., LOW H., CRANE F.L. 1997. Inhibition of DNA synthesis in CCL 39 cells by impermeable iron chelators. *Biochem. Mol. Bio. Int.* **41**(2) : 303-310
- ANDERSEN J.B., STERNBERG C., POULSEN LK, BJORN S.P., GIVSKOV M., MOLIN S. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* June **64**(6):2240-6.
- ASCHNER J.L. ET ASCHNER M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol. Asp. Med.* **26**:353–362.
- BANJERDKIJ P., VATTANAVIBOON P., AND MONGKOLSUK S. 2005. Exposure to Cadmium Elevates Expression of Genes in the OxyR and OhrR Regulons and Induces Cross-Resistance to Peroxide Killing Treatment in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol. Apr.*, **71**(4): 1843–1849.
- BELLINI P. AND HEMMINGS A.M. 2006. *In Vitro* Characterization of a Bacterial Manganese Uptake Regulator of the Fur Superfamily. *Biochemistry.* **45**: 2686-2698.
- BERGEVIN I. 2003. Étude de la régulation du gène *mntH* de *Escherichia coli*. Mémoire présenté pour l'obtention du grade Maître ès Sciences (M. Sc.) en Microbiologie Appliquée. Université du Québec, INRS-Institut Armand-Frappier.
- BOTTELDOORN N., VAN COILLIE E., GRIJSPEERDT K., WERBROUCK H., HAESEBROUCK F., DONNE E., D'HAESE E., HEYNDRICKX M., PASMANS F., HERMAN L. 2005. Real-time reverse transcription PCR for the quantification of the *mntH* expression of *Salmonella enterica* as a function of growth phase and phagosome-like conditions. *J. Microbio. Methods* (Article in press)
- BOYER, E., BERGEVIN I., MALO D., GROS P. AND 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**(11): 6032-42.
- BRAUN, V. AND HANTKE, K. 2001. Mechanisms of bacterial iron transport in Microbial transport systems, Edited by Winkelmann G. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- BRENNER B.M., LEVINE S.A. 2004. Chapter 6 - The Molecular Basis of Solute Transport Brenner & Rector's - The Kidney, 7th ed. Saunders, An Imprint of Elsevier, Philadelphia PA
- BUCHANAN S.K. 2005. Bacterial metal detectors. *Mol. Microbio.* **58**(5):1205-1209.
- BUMANN D. 2001. Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect. Immun.* December **69**(12):7493-500.

- CELLIER, M. 2001. Bacterial genes controlling manganese accumulation in Microbial transport systems, Edited by Winkelmann G. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- CELLIER M.F.M., BERGEVIN I., BOYER E. AND RICHER E. 2001. Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends in Genetics*. **17**(7): 365-370.
- CELLIER, M., PRIVÉ G., BELOUCHI, A., KWAN, T., RODRIGUES, V., CHIA, W. AND GROS P. 1995. Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10089-10093.
- COURVILLE P., CHALOUPKA R., VEYRIER F. AND CELLIER M.F. 2004. Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog. *J. Biol. Chem.* **279**(5): 3318-26.
- CROSA J.H. AND WALSH C.T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* June **66**(2): 223–249.
- CUELLAR-MATA P., JABADO N., LIU J., FURUYA W., FINLAY B.B., GROS P., GRINSTEIN S. 2002. Nramp1 modifies the fusion of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles with cellular endomembranes in macrophages. *J. Biol. Chem.* Jan 18; **277**(3):2258-65.
- D'AUTREAUX B., TOUATI D., BERSCH B., LATOUR J.M., MICHAUD-SORET I. 2002. Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. December 24; **99**(26):16619-24.
- DASHPER S.G., BUTLER C.A., LISSEL J.P., PAOLINI R.A., HOFFMANN B., VEITH P.D., O'BRIEN-SIMPSON N.M., SNELGROVE S.L., TSIROS J.T., AND REYNOLDS E.C. 2005. A novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation. *J. Biol. Chem.* July 29, **280**(30): 28095–28102
- DELANY I., GRIFANTINI R., BARTOLINI E., RAPPUOLI R., AND SCARLATO V. 2006. Effect of *Neisseria meningitidis* Fur mutations on global control of gene transcription. *J. Bacteriol. Apr.* **188**(7): 2483–2492.
- DIAZ P.I., SLAKESKI N., REYNOLDS E.C., MORONA R., ROGERS A.H., AND KOLENBRANDER P.E. 2006. Role of *oxyR* in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol. Apr.* **188**(7):2454–2462.
- DÍAZ-MIRELES E., WEXLER M., TODD J.D., BELLINI D., JOHNSTON A.W.B. AND SAWERS R.G. 2005. The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiology*. **151**, 4071–4078

- D'SOUZA J., CHEAH P.Y., GROS P., CHIA W., 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. Jul; **202**(Pt 14):1909-15.
- FRAGA C.G. 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. Mol. Asp. Med. **26**, 235–244
- GANCZ H., CENSINI S., AND MERRELL D.S. 2006. Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. Jan. **74**(1): 602–614.
- GREEN J. ET PAGET M.S. 2004. Bacterial redox sensors. Nature Reviews in Microbiology. Dec; **2**(12):954-66.
- GRUENHEID S., PINNER E., DESJARDINS M., GROS P. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. J. Exp. Med. Feb 17; **185**(4):717-30.
- HAEMIG H.A.H. ET BROOKER R.J. 2004. Importance of conserved acidic residues in MntH, the Nramp homolog of *Escherichia coli*. J. Memb. Biol. **201**:97–107
- HANTKE, K. 2001. Bacterial Zinc Transport in Microbial transport systems, Edited by Winkelmann G. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- HANTKE K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Cur. Opini. Microbio. **4**:172-177
- HANTKE, K. 2003. Is bacterial FeoB a living fossil? Trends in Microbiology. May, **11**(5): 192-195.
- HANTKE K. 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. Curr. Opini. Microbiol. April, **8**(2):196-202.
- HEATH JD, PERKINS JD, SHARMA B, WEINSTOCK GM. 1992. *NotI* genomic cleavage map of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. J. Bacteriol. Jan; **174**(2):558-67.
- HELMAN J.D. 2004. Regulation of bacterial MntH genes in The Nramp Family. Edited by Cellier M. and Gros P. Landes Biosciences.
- HUANG X., DAI J., FOURNIER J., ALI A.M., ZHANG Q. AND FRANKEL K. 2002. Ferrous ion autooxidation and its chelation in iron-load human liver HepG2 cells. Free Radical Biology and medicine. **32**(1) : 84-92
- IKEDA J.S., JANAKIRAMAN A., KEHRES D.G., MAGUIRE M.E., AND SLAUCH J.M. 2005. Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium by MntR and Fur. J. Bacteriol. February, **187**(3): 912-922

- JOHNSON J.R., CLABOTS C., AND ROSEN H. 2006. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator *oxyR* on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Inf. Immun.* Jan. **74**(1): 461–468.
- KEHRES D.G. AND MAGUIRE M.E. 2003. Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* Jun; **27**(2-3):263-90.
- KILEY P.J., STORZ G. 2004. Exploiting thiol modifications. *PLoS Biology.* November, **2**(11): 1714-1717
- KNODLER L.A., BESTOR A., MA C., HANSEN-WESTER I., HENSEL M., VALLANCE B.A., AND STEELE-MORTIMER O. 2005. Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Inf. Immun.* **73**(10): 7027-7030.
- KÖSTER W. 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* **152**: 291–301
- KUMAR V., ABBAS A.K., FAUSTO N. 2005. Chapter 13. Red blood and bleeding disorders in Robbins and Cotran PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE, Seventh Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia PA.
- JABADO N., JANKOWSKI A., DOUGAPARSAD S., PICARD V., GRINSTEIN S AND 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.* November 6, **192**(9): 1237–1247
- LEE J.W., AND HELMANN J.D. 2006. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature.* 16 March, **440**: 363-367.
- LIN H., FISCHBACH M.A., LIU D.R., AND WALSH C.T. 2005. *In vitro* characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J. Am. Chem Soc.* Aug 10; **127**(31):11075-84.
- LODISH H., BALTIMORE D., BERK A., ZIPURSKY S.L., MATSUDAIRA P., DARNELL J. 1997. Biologie Moléculaire de la Cellule, 3e edition. DeBoeck Université

- LOW Y.L., JAKUBOVICS N.S., FLATMAN J.C., JENKINSON H.F., AND SMITH A.W. 2003. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. J. Med. Microbiol. **52** : 113-119
- MALIK S., ABEL L., TOOKER H., POON A., SIMKIN L., GIRARD M., ADAMS G.J., STARKE J.R., SMITH KIMBERLY C., GRAVISS E.A., MUSSER J.M., AND SCHURR E. 2005 Alleles of the *NRAMP1* gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. August 23, **102**(34): 12183-12188
- MANEN D, POUGEON M, DAMAY P, 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. Feb 28; **186**(2):197-200
- MASSÉ E., ARGUIN M. 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. Trends in Bioch. Sci. August, **30**(8): 462-468.
- MARRA A., LAWSON S., ASUNDI J.S., BRIGHAM D. AND HROMOCKYJ A.E. 2002. *In vivo* characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. Microbiology. **148**:1483–1491
- MEY A.R., WYCKOFF E.E., KANUKURTHY V., FISHER, CAROLYN R., AND PAYNE S.M. 2005. Iron and Fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of Fur in virulence. Infect. Immun. Dec. **73**(12):8167–8178.
- MIKI T, YASUKOCHI T, NAGATANI H, FURUNO M, ORITA T, YAMADA H, IMOTO T, HORIUUCHI T. 1987. Construction of a plasmid vector for the regulatable high level expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli*: an application to overproduction of chicken lysozyme. Protein engineering. Aug-Sep, **1**(4):327-32
- MILLER J.H. 1992. A Short Course In Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria. Cold Spring Harbor NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- MILLS S.A. AND MARLETTA M.A. 2005. Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the Ferric Uptake Regulator from *Escherichia coli*. Biochemistry. **44**:13553-13559
- MOBLEY H.L.T., GREEN D.M., TRIFILLIS A.L., JOHNSON D.E., CHIPPENDALE G.R., LOCKATELL V. C., JONES B.D., AND. WARREN J.W. 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: Role of Hemolysin in Some Strains. Infect. Immun. May, **58**(5):1281-1289
- MONGKOLSUK S. ET HELMANN JD. 2002. Regulation of inducible peroxide stress responses. Mol. Microbiol. **45**: 9.

- MOURIÑO S., OSORIO C.R., LEMOS MANUEL L., CROSA J.H. 2006. Transcriptional organization and regulation of the *Vibrio anguillarum* heme uptake gene cluster. Gene. Article in press.
- MÜLLER O. AND KRAWINKEL M. 2005. Malnutrition and health in developing countries. C. M. A. J. Aug. 2, **173** (3):279-286.
- MUKHOPADHYAY P., ZHENG M., BEDZYK L.A., LAROSSA R.A., STORZ G. 2004. Prominent roles of the NorR and Fur regulators in the *Escherichia coli* transcriptional response to reactive nitrogen species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Jan 20; **101**(3):745-50.
- NEIDHARDT F.C., BLOCH P.L., SMITH D.F. 1974. Culture medium for enterobacteria. J. Bacteriol. **119** : 736-747
- NILSSON U.A., BASSEN M., SAVMAN K., KJELLMER I. 2002. A simple and rapid method for the determination of "free" iron in biological fluids. Free Radic. Res. **36**(6): 677-684.
- NOAH C.W., SHAW C.I., IKEDA J.S., KREUZER K.S., AND SOFOS J.N. 2004. Development of green fluorescent protein-expressing bacterial strains and evaluation for potential use as positive controls in sample analyses. J. Food Protection, **68**(4):680-686.
- PATZER S.I., 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. August, **183**(16): 4806-4813.
- PERKINS J.D., HEATH J.D., SHARMA B.R., WEINSTOCK G.M. 1993. *Xba*I and *Bln*I genomic cleavage maps of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655 and comparative analysis of other strains. J. Mol. Biol. Jul 20, **232**(2):419-45.
- PINNER E., GRUENHEID S., RAYMOND M., 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. Nov 14; **272**(46):28933-8.
- PITTMAN J.K. 2005. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. New Phytologist **167**: 733–742.
- POOLE L.B. 2005. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. Arch. Biochem. Biophys. **433**, 240–254.
- POSEY J.E. AND GHERARDINI F.C. 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. Science. 2 June: **288**(5471): 1651 – 1653.

- RAYMOND K.N., DERTZ E.A., AND KIM S.S. 2003. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. April 1, **100**(7): 3584-3588
- RICHER, E., COURVILLE P., BERGEVIN I. AND. CELLIER M.F. 2003. Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria. *J. Mol. Evol.* **57**(4): 363-76.
- RODRIGUEZ G.M. AND SMITH I. 2006. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* Jan. **188**(2):424-430.
- ROBSON H.G., VAS S.I. 1972. Resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium*. *J. Infect Dis.* 1972 Oct. **126**(4):378-86.
- SABRI M., LÉVEILLÉ S., AND DOZOIS C.M. 2006. A SitABCD homologue from avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*. **152**, 745-758.
- SAINT-RUF C. AND MATIC I. 2006. Environmental tuning of mutation rates. *Environ. Microbiol.* **8**(2):193-199.
- SALEZ L., MALO D. 2004. Protagonistes de l'immunité innée dans les infections à salmonelles. *MEDECINE/SCIENCES*. **20**: 1119-24.
- SCHALK I.J., YUE W.W., AND BUCHANAN S.K. 2004. Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Mol. Microbiol.* **54**(1):14-22.
- STORZ G., IMLAY J.A. 1999. Oxidative Stress. *Current Opinion in Microbiol.* **2**: 188-194.
- TEBO B.M., JOHNSON H.A., MCCARTHY J.K., AND TEMPLETON A.S. 2005. Geomicrobiology of manganese(II) Oxidation. *TRENDS in Microbiology*. September **13**(9):421-428.
- TISS A., BARRE O., MICHAUD-SORET I., AND FOREST E. 2005. Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Letters*. **579**, 5454-5460.
- VIDAL S.M., MALO D., VOGAN K., SKAMENE E., GROS P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell*. May 7, **73**(3):469-85.
- VIDAL S.M., PINNER E., LEPAGE P., GAUTHIER S., GROS P. 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J. Immunol.* Oct 15, **157**(8):3559-68.
- WAGNER D., MASER J., MORIC I., BOECHAT N., VOGT S., GICQUEL B., LAI B., REYRAT J-M., AND BERMUDEZ L. 2005. Changes of the phagosomal elemental concentrations by *Mycobacterium tuberculosis* Mramp. *Microbiology*. **151**, 323-332.

-
- WANDERSMAN C. ET DELEPELAIRE P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Ann. Rev. Microbiol.* October, **58**: 611-647.
- WIENER M.C. 2005. TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque? *Current Opinion in Structural Biology.* **15**:394–400
- WINKELMANN G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions.* **30**(4): 691-696
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. Iron Deficiency Anaemia – Assessment, Prevention, and Control: *A guide for programme managers*. Publication number: WHO/NHD/01.3
- ZAHARIK M.L, CULLEN V.L., FUNG A.M., LIBBY S.J., KUJAT CHOY S.L., COBURN B., KEHRES D.G., MAGUIRE M.E., FANG F.C. AND FINLAY B.B. 2004. The *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Divalent Cation Transport Systems MntH and SitABCD Are Essential for Virulence in an *Nramp1*G169 Murine Typhoid Model. *Infect. Immun.* Sept., **72**(9) :5522–5525
- ZHU M., VALDEBENITO M., WINKELMANN G., HANTKE K. 2005. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiology.* Jul; **151**(Pt7):2363-72.
- ZHENG M., STORZ G. 2000. Redox Sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* **59**: 1-6
- ZHENG M., WANG X., DOAN B., LEWIS K.A., SCHNEIDER T.D., AND STORZ G. 2001. Computation-Directed Identification of OxyR DNA Binding Sites in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* Aug, **183**(15): 4571–4579