

Élise Boyer

**Rôle de MntH et de l'acquisition du fer et du manganèse dans
la virulence de *Salmonella typhimurium***



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

INRS-Institut Armand-Frappier

Laval, Québec

Avril 2002

Table des matières

Table des matières.....	I
Liste des abréviations.....	V
Liste des figures et tableaux.....	VII
Sommaire	IX
Introduction.....	1
Revue de littérature	5
1. Le genre <i>Salmonella</i>	5
1.1. Nomenclature.....	5
1.2. Pathologies : la fièvre typhoïde et les salmonelloses.....	5
1.3. <i>S. typhimurium</i> : le modèle de la fièvre typhoïde chez la souris.....	7
1.3.1. Variation génétique : <i>Ity^r</i> et <i>Ity^s</i>	7
1.3.2. Les étapes de l'infection de la souris par <i>S. typhimurium</i>	8
1.4. Les gènes de virulence et le transfert horizontal.....	10
1.4.1. Îlots et îlets de pathogénicité.....	10
1.4.2. Les systèmes de sécrétion de type III et les protéines effectrices.....	10
1.4.3. Les gènes de virulence incluent des transporteurs de métaux divalents	12
1.4.4. Régulation : HilA et PhoP/PhoQ	12
2. L'hôte : la défense.....	14
2.1. La défense globale : le système immunitaire et la réponse à <i>S. typhimurium</i>	14

2.2. La maturation du phagosome : de l'internalisation au phagolysosome	15
2.2.1. Le processus normal de maturation du phagosome	15
2.2.2. Le phagosome de <i>Salmonella</i>	16
2.3. La défense liée à l'O ₂ et au N ₂	17
2.3.1. La production de radicaux oxygénés et azotés.....	17
2.3.2. Les mécanismes d'action sur les bactéries.....	18
2.3.3. La défense bactérienne contre les radicaux oxygénés et azotés.....	18
2.3.4. La NADPH oxydase et la iNOS et l'interaction avec <i>S. typhimurium</i>	20
2.4. La résistance conférée par le gène <i>Nramp1</i>	21
2.4.1. La découverte et la caractérisation de <i>Nramp1</i>	21
2.4.2. La fonction de <i>Nramp1</i> : prédiction et démonstration	21
3. Importance des métaux divalents fer et manganèse lors de l'infection	23
3.1. Le fer : propriétés et réaction de Fenton	23
3.2. Le manganèse : propriétés	25
3.3. Les métaux et la résistance au stress oxydatif.....	25
3.4. Les enjeux lors de l'infection.....	27
4. Les transporteurs de fer et de manganèse chez <i>Salmonella</i>	28
4.1. Acquisition du fer ferrique.....	29
4.1.1. Les sidérophores	29
4.1.2. L'importance de la protéine TonB	30
4.1.3. Les protéines riches en fer	31

4.1.4. Implication dans les premières étapes de l'infection	31
4.2. Acquisition du fer ferreux et du manganèse	32
4.2.1. FeoABC	32
4.2.2. MntH	33
4.2.3. SitABCD	34
4.2.4. SfbABC.....	36
4.3. Redondance dans les systèmes d'acquisition.....	36
Discussion/Conclusion.....	39
1. La construction des mutants.....	39
1.1. La souche <i>mntH</i>	39
1.2. La souche <i>feoB</i>	39
1.3. La souche <i>sitABCD</i>	40
1.4. La souche <i>tonB</i>	40
1.5. La complémentation fonctionnelle du transport de cations par <i>mntH</i>	40
2. La caractérisation des mutants	41
2.1. <i>mntH</i> , <i>sitABCD</i> et <i>feoB</i> et l'acquisition du fer et du manganèse	41
2.2. Implication dans la virulence	44
2.3. Implication dans la survie intracellulaire dans les macrophages	46
2.4. Le manganèse et la sensibilité au stress oxydatif.....	48
3. Problématiques et perspectives	49
Remerciements.....	53

Bibliographie.....	55
Annexe 1 : Figure 5.....	81
Annexe 2 : Figure 6.....	82
Annexe 3 : Figure 7.....	83
Annexe 4 : Article.....	84
Annexe 4 : Accusé de réception	126
Annexe 5 : Autorisation de reproduction.....	127
Annexe 6 : État de la contribution de l'étudiant	128

Liste des abréviations

ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BPS	« bathophenanthroline disulfonic acid »
CD	« cluster of differentiation »
CDC	« cell division cycle »
CGD	« chronic granulomatous disease »
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DP	<i>2,2-dipyridyl</i>
DTPA	diethylene triamine pentaacétate
GDP	guanosine diphosphate
GTP	guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
IFN	interféron
IL	interleukine
iNOS	« inducible nitric oxide synthase »
IVET	« in vivo expression technology »
lamp1	« lysosomal membrane-associated protein-1 »
LEE	« locus of enterocyte effacement »
LPS	lipopolysaccharides
NK	« natural killer »
O ₂ ⁻	anion superoxyde

pag	« PhoP activated genes »
prg	« PhoP repressed genes »
SPI	« Salmonella pathogenicity island »
SOD	superoxyde dismutase
TNF	« tumor necrosis factor »
ttss	« type three secretion system »

Liste des figures et tableaux

Figure 1	article	Growth in minimal medium limited in iron and manganese and divalent metal ion uptake
Figure 2	article	Mortality after intra-venous infection of 129/Sv and 129/Sv <i>Nramp1</i> ^{-/-} mice
Figure 3	article	Intracellular survival and replication of <i>Salmonella</i> strains in macrophage-like cells determined by CFU plating
Figure 4	article	Functional complementation of the <i>Salmonella</i> serovar Typhimurium <i>mntH sitAD</i> (MS) phenotype <i>in vitro</i> by over-expression of the full-length <i>mntH</i> gene.
Figure 5	annexe 1	Inactivation des gènes <i>feoB</i> , <i>sitABCD</i> et <i>mntH</i> chez <i>S.</i> 81 <i>typhimurium</i> keller
Figure 6	annexe 2	Survie et réplication intracellulaire de 5 souches de <i>S.</i> 82 <i>typhimurium</i> dans la lignée de macrophages RAW 264.7
Figure 7	annexe 3	Survie des souris 129/Sv <i>Nramp1</i> ^{-/-} après injection intra- 83 veineuse de 10 ³ bactéries
Tableau 1	article	Characteristics of bacterial strains, plasmids and phages used in this study

Sommaire

Ces dernières années ont vu l'augmentation majeure des cas de salmonelloses dans les pays développés et le diagnostic d'encore trop nombreux cas de fièvre typhoïde dans les pays en voie de développement. Deux problématiques qui, couplées au phénomène de résistance aux antibiotiques, illustrent toute l'importance de la recherche liée à l'interaction hôte-pathogène des bactéries du genre *Salmonella*.

Salmonella typhimurium est un pathogène intracellulaire du macrophage. Sa survie et répllication à l'intérieur du phagosome constitue l'étape-clé de l'infection. Plusieurs gènes essentiels à la virulence de *Salmonella* permettent l'adaptation au phagosome dont un grand nombre ont été acquis par transfert horizontal et sont inclus dans des îlots de pathogénicité, des îlots ou des séquences homologues à des phages. Parmi ces gènes de virulence certains peuvent limiter la maturation du phagosome comme le produit du gène *spiC* qui bloque la fusion du phagosome avec les lysosomes (164). D'autres contribuent à diminuer le stress oxydatif comme les protéines effectrices de l'îlot de pathogénicité 2 qui empêchent la colocalisation de l'enzyme NADPH phagocyte oxydase au phagosome de *Salmonella* (170). Enfin, d'autres gènes de virulence, comme l'opéron *sitABCD*, sont en fait des transporteurs de cations divalents qui permettraient l'adaptation à l'environnement pauvre en cations qu'est le phagosome (96, 179). D'autres exemples encore montrent combien l'évolution conjointe du pathogène et de son hôte a favorisé l'acquisition et le maintien par *Salmonella* de gènes nécessaires à la survie dans le phagosome, mais également à l'une ou l'autre des étapes de l'infection. Pour *S. typhimurium* chez la souris et *S. typhi* chez l'humain ces étapes se déroulent dans des environnements aussi différents que l'estomac, les cellules intestinale, les plaques de Peyer et les phagocytes du foie et de la rate.

Un facteur de résistance à l'infection par des parasites intracellulaires du macrophage comme *Salmonella*, a été identifié par clonage positionnel chez la souris (173). Originellement désigné locus *Ity/Lsh/Bcg* en raison de sa découverte par trois équipes indépendantes et de la résistance conférée respectivement à *Salmonella*, *Leishmania* et *M. bovis* BCG, le locus a été rebaptisé *Nramp* puis *Nramp1* pour « Natural resistance associated macrophage protein ». La protéine est exprimée uniquement dans les phagocytes professionnels et colocalise au phagosome de *Salmonella* et de *Yersinia* (68,

Nramp1. Le fer et le manganèse, ainsi gagnés dans la compétition avec le macrophage permettraient la croissance et une plus grande résistance au stress oxydatif.

Introduction

Le gène *Nramp1*, auparavant le locus *Ity/Lsh/Bcg*, est associé depuis déjà plusieurs décennies à la résistance à des parasites intracellulaires du macrophage. La découverte de gènes homologues chez les bactéries laissait entrevoir un rôle potentiel dans l'interaction hôte-pathogène au niveau du macrophage. Des travaux récents dans le laboratoire ont permis de montrer le transport des cations divalents Mn^{2+} et Fe^{2+} par la protéine MntH de *E. coli* (114). Les travaux d'autres équipes sur les homologues Nramp bactériens ont également relié la fonction de la protéine au transport des cations divalents (3, 100, 138). Pour faire suite aux travaux du laboratoire, il devenait intéressant d'étudier l'implication du gène *mntH* dans les relations hôte-pathogène, mais cette voie ne pouvait être engagée avec la souche non-pathogène *E. coli* K12 utilisée précédemment. Ainsi, pour étudier l'importance du gène *mntH* et de l'acquisition du fer et du manganèse dans la virulence d'un pathogène intracellulaire du macrophage le choix s'est porté sur *S. typhimurium*. La souche utilisée est l'isolat clinique keller qui a servi dans le passé à définir les phénotypes de sensibilité et de résistance à l'infection par *S. typhimurium*.

Le projet de recherche s'appuie sur le modèle hypothétique de compétition entre la bactérie *Salmonella* et le macrophage pour l'acquisition des cations divalents au niveau du phagosome. La stratégie choisie consiste en l'inactivation du gène *mntH* de *S. typhimurium* et en la caractérisation du mutant *in vivo* et *in vitro*. Toutefois, la grande redondance dans les systèmes d'acquisition du fer et la possibilité d'un transport de manganèse par un système alternatif nous a amené à considérer dès le départ la combinaison de la mutation *mntH* à d'autres mutations dans les différents systèmes d'acquisition des cations divalents. De cette manière, si la perte d'un système est compensée par un autre, l'altération de la fonction pourra s'observer chez un double ou même un triple mutant. Cette question de la compensation a d'ailleurs été maintes fois soulevée lors de l'étude de souches déficientes pour un et même deux systèmes pour expliquer le peu d'effet *in vivo* et/ou *in vitro* (130, 162, 179).

Les mutations étudiées conjointement avec *mntH* sont *sitABCD*, *feoB* et *tonB*. Dans la souche *sitABCD* aucun gène de l'opéron n'est fonctionnel puisque la séquence comprenant la totalité des gènes *sitB* et *sitC* de même qu'une partie importante de *sitA* et *sitD* a été remplacée par une cassette de résistance à la streptomycine. L'opéron a été

montré essentiel à la virulence et relié à l'acquisition du fer (96, 179). Par homologie au système *yfeABCD* de *Yersinia pestis*, *sitABCD* coderait pour un transporteur de fer et potentiellement de manganèse (12, 13). Les souches *feoB* et *tonB* ont été générées par échange des gènes fonctionnels contre des gènes inactivés par insertion de cassettes de résistance à la tétracycline et à la kanamycine (162). La protéine FeoB fait partie du transporteur codé par les gènes *feoABC* qui permet l'acquisition du fer ferreux (99). La protéine TonB est une protéine membranaire nécessaire au rapatriement de nombreux sidérophores et, par conséquent, à l'acquisition du fer ferrique (128). La combinaison des mutations a permis de générer quatre double mutants, *mntH sitABCD*, *mntH feoB*, *mntH tonB* et *sitABCD feoB*, ainsi qu'un triple mutant *mntH sitABCD feoB*.

Des outils développés dans le laboratoire permettent une caractérisation des mutants *in vitro* dans différents stress. La croissance en milieu riche avec le chélateur 2,2-dipyridyl (DP), la croissance dans un milieu minimum en conditions limitantes de fer, la sensibilité au peroxyde d'hydrogène sont autant de tests permettant de relier les mutations à des défauts d'acquisition des cations divalents. Une procédure pour mesurer l'acquisition des radio-isotopes ^{55}Fe et ^{54}Mn est aussi en place et permet de démontrer directement un défaut d'acquisition de ces métaux. Pour compléter la caractérisation *in vitro*, il restait à adapter l'essai à la gentamycine pour étudier la survie et la réplique des différentes souches de *S. typhimurium* dans les macrophages (110). L'essai a été mis en place avec la lignée de macrophages murins RAW264.7. Cette lignée est *Nramp*^{-/-}, mais nous avons aussi eu l'opportunité de travailler avec un transfectant stable *Nramp*⁺.

Pour la caractérisation *in vivo*, nous avons collaboré avec le Dr Danielle Malo et avons pu utiliser les souris 129sv et 129sv *Nramp*^{-/-}. Le gène *Nramp* murin fait partie du modèle élaboré et son inactivation est nécessaire pour voir le phénotype de susceptibilité à *S. typhimurium* dans les conditions choisies. L'utilisation de souris « knock-out » pour le seul gène *Nramp* fournit un avantage par rapport à d'autres équipes qui utilisent des lignées de souris sensibles et résistantes, mais dont la différence génétique ne se limite pas à un seul gène.

Le projet de maîtrise inclut donc un volet important de biologie moléculaire pour réaliser les différentes mutations, leur combinaison ainsi que le clonage du gène *mntH* pour des expériences de complémentation. Le deuxième volet consiste en la caractérisation *in vitro*

et *in vivo* des mutants générés. Il a été réalisé avec des tests en place à l'intérieur du laboratoire, croissance en milieu minimum et avec des chélateurs, sensibilité au peroxyde d'hydrogène, et à l'extérieur du laboratoire, infections *in vivo* chez les souris 129sv et 129sv Nramp1^{-/-}. Un outil restait à mettre en place soit l'essai à la gentamycine pour mesurer la survie et la réplication dans les macrophages. Les expériences d'incorporation de ⁵⁵Fe et ⁵⁴Mn réalisées dans le laboratoire ont ajouté à la valeur des résultats obtenus.

Revue de littérature

1. Le genre *Salmonella*

1.1. Nomenclature

La première souche du genre *Salmonella* a été identifiée en 1885 par le chirurgien américain Daniel E. Salmon, qui a donné son nom au taxon *Salmonella*. En l'an 2000, on comptait pas moins de 2463 sérotypes pour le genre (19). Si l'on attribuait, comme le voulait la première classification, un sérotype à une espèce, le genre *Salmonella* comprendrait donc près de 2500 espèces. Depuis, la nomenclature a été revue plusieurs fois et l'on a recours à la division en espèces, sous-espèces et sérotypes avec la conséquence qu'une certaine confusion entoure souvent l'appellation exacte des bactéries du genre *Salmonella*.

La première revue importante de la nomenclature s'est faite dans les années 1970, quand la biologie moléculaire a permis de montrer que les sous-genres alors définis étaient plutôt reliés au niveau de l'espèce. Une seule espèce, *Salmonella choleraesuis*, a alors été proposée pour le genre (34). L'espèce a par la suite été rebaptisée *Salmonella enterica* pour éviter la confusion avec le sérotype Choleraesuis (42). Une seconde espèce, *Salmonella bongori*, a été définie plus de quinze ans plus tard (145). L'espèce *Salmonella enterica* est aujourd'hui divisée en six sous-espèces et près de 99% des infections à *Salmonella* chez les humains et les autres animaux à sang chaud sont attribuables à la sous-espèce I *enterica* qui comprend près de 1500 sérotypes (19). Parmi ceux-ci mentionnons les sérotypes Typhi, Paratyphi, Typhimurium, Enteritidis et Choleraesuis. Heureusement, il est acceptable et fort répandu de remplacer l'appellation complète, par exemple *Salmonella enterica* sous-espèce *enterica* sérotype Typhimurium, par la diminution *S. typhimurium*.

1.2. Pathologies : la fièvre typhoïde et les salmonelloses

Le degré de parenté élevé de ces sérotypes n'empêche pas que les infections liées à *Salmonella* chez l'humain diffèrent considérablement. On pourrait diviser en deux grands groupes les pathologies observées. Tout d'abord, celui des fièvres entériques est relié aux

sérotypes Typhi et Paratyphi. Le deuxième groupe, celui des salmonelloses, serait composé notamment des sérotypes Typhimurium et Enteritidis.

Salmonella enterica ssp. *enterica* sérotype Typhi (*S. typhi*) est l'agent de la fièvre typhoïde, une maladie infectieuse qui est un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement. Les signes extérieurs sont des fièvres aiguës, des maux de tête, des nausées et une perte d'appétit accompagnés parfois de diarrhée. La consommation de nourriture et d'eau contaminées par le pathogène est responsable de la transmission de la maladie. Le taux de mortalité, qui voisine les 10%, peut être ramené à moins de 1% avec un traitement antibiotique. Néanmoins, ce traitement est loin d'être accessible à tous et en 1997, l'Organisation mondiale de la santé estimait encore le nombre annuel de décès imputables à *S. typhi* à 600 000 et le nombre d'infections à 17 000 000. *S. paratyphi* cause également des fièvres sévères chez les humains et les primates supérieurs. Les symptômes sont semblables à ceux de la fièvre typhoïde, mais le taux de mortalité est inférieur (1).

Très différentes des fièvres entériques, les salmonelloses sont des infections alimentaires qui provoquent des diarrhées importantes, des douleurs abdominales, des nausées, de la fièvre et parfois de la déshydratation. *S. typhimurium* et *S. enteritidis* en sont les principaux agents. La contamination de certains aliments, notamment la viande, la volaille, les œufs et le lait, en est la cause. Plusieurs pays industrialisés ont connu ces dernières années une augmentation du nombre de cas d'infections alimentaires liées à *Salmonella*, mais aussi à d'autres pathogènes. Le traitement et les préventions des salmonelloses engendrent des coûts sociaux très élevés dans tous les pays développés. À la fin des années 1990, les États-Unis dépensaient en moyenne 4 000 000 \$US annuellement et la Grande-Bretagne 1 000 000 \$US pour les seules infections liées à *S. typhimurium* et *S. enteritidis* (1). En plus de l'aspect monétaire, le prix à payer comporte une baisse de la confiance des citoyens envers l'industrie alimentaire et envers les organisations publiques supposées les protéger.

Un problème préoccupant concernant toutes les infections liées au genre *Salmonella* est l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. Les premiers cas ont été observés avec *S. typhi* au Mexique et au Viêt-Nam au début des années 1970. En l'espace de quelques années, 75% des cas répertoriés dans ces deux pays étaient résistants (1). Quant à *S. typhimurium*, avec la propagation de la souche DT104, résistante à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfonamides et à la tétracycline, la situation n'est guère moins inquiétante (62). En Grande-Bretagne,

l'augmentation remarquée du nombre d'infections liées à cette souche a mis les autorités sur un pied d'alerte depuis déjà quelques années (177). La recherche d'alternatives aux antibiotiques pour faire face au problème de multirésistance demeurera un enjeu majeur des prochaines années pour *Salmonella* comme pour beaucoup d'autres pathogènes humains. Les différents facteurs de virulence de *Salmonella*, notamment les transporteurs de métaux, sont autant de cibles thérapeutiques potentielles.

1.3. *S. typhimurium* : le modèle de la fièvre typhoïde chez la souris

De tous les représentants du genre *Salmonella*, le plus étudié en recherche est *S. typhimurium*. Son intérêt réside dans le modèle qu'il fournit chez la souris. En effet, la bactérie, qui chez l'humain ne provoque que la diarrhée, cause chez la souris une manifestation systémique apparentée à la fièvre typhoïde. Le modèle murin de la fièvre typhoïde, développé depuis les années 1960, est aujourd'hui utilisé de façon routinière.

1.3.1. Variation génétique : *Ity^r* et *Ity^s*

La susceptibilité des souris à l'infection par *S. typhimurium* n'est pas invariante. Très tôt, la découverte de lignées de souris résistantes a amené l'identification d'un locus de résistance sur le chromosome 1 désigné *Ity* (132). Les souris homozygotes *Ity^s* succombaient à l'infection en quelques jours alors que les souris *Ity^r* survivaient à l'injection de la même dose de l'agent infectieux. Le gène dominant *Ity* de résistance à *Salmonella* s'est avéré être le même locus que les gènes *Lsh* et *Bcg* de résistance à *Leishmania* et *M. bovis* BCG identifiés de façon indépendante (18, 74). Le gène, identifié par clonage positionnel et dénommé *Nramp* puis *Nramp1*, est donc un facteur impliqué dans la résistance non-spécifique à des pathogènes intracellulaires du macrophage (173). Les modèles murins développés pour *S. typhimurium* doivent considérer la présence ou l'absence d'un gène *Nramp1* fonctionnel.

La recherche de déterminants génétiques conférant un avantage dans la lutte antimicrobienne est une stratégie classique et a conduit, en plus de *Nramp1*, à la découverte de d'autres loci. Par clonage positionnel, le gène « Toll-like-receptor » Tlr4 a été relié au locus *lps* du chromosome 4 qui, par une trop faible réponse aux lipopolysaccharides bactériens, confère la susceptibilité aux infections par des bactéries Gram négatives (139). Par la suite, le gène du Tlr5, présent sur le chromosome 1 comme *Nramp1*, a aussi été relié à la susceptibilité aux infections par des bactéries Gram négatives (149).

1.3.2. Les étapes de l'infection de la souris par *S. typhimurium*

L'entrée du pathogène se faisant par la voie orale, les bactéries sont d'abord soumises à l'acidité de l'estomac, aux sels biliaires puis à des peptides antimicrobiens présents à la muqueuse intestinale. Ces peptides, en créant des liaisons ioniques avec les lipopolysaccharides bactériens, perméabilisent les membranes externe et interne des bactéries provoquant la lyse des cellules bactériennes. La défense des pathogènes dépend des gènes *pmrE*, *pmrF*, *pmrG* et *pagP*, dont les produits en se liant aux composantes de la membrane externe en modifient la surface (85). Les trois premiers gènes sont contrôlés par le système PmrA/PmrB qui, lui-même et comme *pagP*, est régulé par PhoP/PhoQ, un système à deux composantes qui est commun à une multitude d'autres gènes de virulence de *Salmonella* (81, 82, 84).

La première barrière rencontrée est la barrière intestinale. Les bactéries possèdent des moyens de s'y adhérer qui facilitent ensuite leur traversée. *S. typhimurium* contient quatre opérons codant pour des fimbriae, *fim*, *lpf*, *pef* et *agf*, qui contribuent à la virulence (165). Le répertoire des fimbriae variant d'un sérotype de *Salmonella* à l'autre, il permettrait d'orienter le tropisme vers les différents épithélia.

Les cellules épithéliales qui forment la paroi de l'intestin ne peuvent être infectées par leur côté apical, seulement par leur côté basolatéral. Elles ne peuvent donc pas servir de porte d'entrée pour le pathogène. Une classe spéciale de cellules épithéliales, les cellules M, caractérisées par une activité pinocytique plus élevée, vont permettre l'infection (97). L'interaction entre *Salmonella* et les cellules M va induire une réorganisation du cytosquelette et des membranes de la cellule permettant l'internalisation de la bactérie. Ce processus actif est dépendant de plusieurs gènes bactériens, dont les gènes de virulence *invABCD* (57). Les produits de ces gènes interagissent directement avec la cellule hôte et participent à l'induction du changement de conformation. Paradoxalement, des bactéries déficientes *invA* conservent la capacité de traverser la barrière épithéliale et de causer la mortalité des souris, suggérant ainsi l'existence d'une seconde voie d'entrée. Une voie passant par des phagocytes CD18⁺ a récemment été décrite. Des bactéries *Salmonella* déficientes pour l'invasion des cellules M ont été trouvées dans des monocytes du sang périphérique exprimant le marqueur CD18 dans les quelques minutes suivant une administration orale (169). L'intestin pourrait être le lieu d'origine de dissémination par les monocytes, puisqu'on a montré que des monocytes CD18⁺ présents dans la paroi intestinale pouvaient être infectés par ces bactéries déficientes pour l'invasion. (167).

Une fois la barrière épithéliale traversée, *Salmonella* gagne accès au réseau lymphatique et à la circulation. La rencontre avec les cellules phagocytaires, étape déterminante dans l'infection par *Salmonella*, peut avoir lieu dans le réseau lymphatique, les ganglions, la circulation ou les organes du système réticulo-endothélial. Trois issues sont possibles à chaque rencontre (144). La première consiste en la destruction par le phagocyte du pathogène internalisé. La seconde est l'adaptation du pathogène internalisé à l'environnement hostile de son hôte et l'établissement d'un foyer de réplication dans le phagosome. La troisième possibilité est l'apoptose du phagocyte induite par le pathogène. La première et la deuxième possibilité ne sont pas en opposition ; l'issue de l'interaction dépend de plusieurs facteurs à la fois chez l'hôte, dont la premier est l'état d'activation du macrophage, et chez le pathogène. Néanmoins, l'établissement d'un lieu propice à la réplication dans le phagosome du macrophage est l'étape déterminante dans le succès de l'invasion par *Salmonella* (47).

La troisième issue, l'apoptose de la cellule phagocytaire, n'a été décrite que récemment et les mécanismes demeurent encore en bonne partie à élucider. Selon le modèle proposé par S. Falkow, la protéine effectrice bactérienne SipB activerait la caspase-1 permettant ainsi l'activation des cytokines pro-inflammatoires pro-IL-1 β et pro-IL-18 (122). Ce mécanisme favoriserait la colonisation efficace des plaques de Peyer dans l'intestin. Un deuxième mécanisme d'induction de l'apoptose et indépendant de SipB a aussi été décrit. Cette deuxième voie surviendrait plus tard dans le cours de l'infection. Les protéines effectrices OmpR et SpvR y seraient impliquées (111, 166).

La découverte de mécanismes d'induction de l'apoptose chez *S. typhimurium* n'a jamais permis de remettre en cause l'importance de la survie et de la réplication intracellulaire dans le macrophage. L'adaptation au phagosome demeure le principal moyen pour *Salmonella* de se répliquer et d'échapper au système immunitaire. L'invasion des phagocytes a comme conséquence l'établissement de foyers d'infection dans le foie et la rate, deux organes du système réticulo-endothélial riches en phagocytes. Quand la multiplication dans ces deux organes est telle que la concentration bactérienne atteint 10^8 - 10^9 CFU/organe, la souris meurt de la réponse de l'organisme aux LPS (33).

1.4. Les gènes de virulence et le transfert horizontal

1.4.1. Îlots et îlets de pathogénicité

Malgré le degré de parenté élevé entre le genre *Salmonella* et le genre *Escherichia*, aucune comparaison n'est possible entre les deux bactéries quant à leur virulence. Cette différence s'explique en partie par les îlots et les îlets de pathogénicité présents chez *Salmonella* et absents chez les souches non-pathogènes d'*E. coli*. Les îlots de pathogénicité de *Salmonella* (SPI pour « *Salmonella* pathogenicity island ») consistent en de larges cassettes incorporées au chromosome qui contiennent des gènes impliqués dans les interactions spécifiques avec l'hôte et qui, dans l'ensemble, sont essentiels à la virulence du pathogène. D'autres pathogènes possèdent également des îlots de pathogénicité. La souche *E. coli* enteropathogénique (EPEC) possède le locus LEE qui est suffisant pour transformer la souche avirulente en un pathogène. Des représentants des genres *Yersinia* et *Shigella* possèdent également des îlots de pathogénicité (116).

Deux indices suggèrent qu'un transfert horizontal est à l'origine des îlots de pathogénicité. Tout d'abord, le contenu en GC des SPI est généralement plus faible que dans le reste du chromosome (37 à 47% par rapport à 52%). En outre, les îlots sont souvent insérés à proximité de certains gènes de l'ARNt. Ces gènes étant peu variables et largement distribués entre les espèces, leur proximité aurait favorisé les phénomènes de recombinaison permettant l'acquisition des SPI (73, 116). Cinq îlots de pathogénicité ont été identifiés chez *Salmonella*. Quant aux îlets de pathogénicité, ils consistent bien souvent en un seul gène de virulence, apparemment acquis par transfert horizontal. Le gène *sifA*, essentiel pour la production des filaments induits par *Salmonella* (*Salmonella*-induced filaments) est compris dans un îlet (151). Outre les îlots et les îlets de pathogénicité, on retrouve chez *Salmonella* un plasmide codant notamment pour les gènes *spv* impliqués dans la virulence, pour le gène du facteur sigma RpoS et les gènes *rck* impliqués dans la résistance au complément (78, 80).

1.4.2. Les systèmes de sécrétion de type III et les protéines effectrices

Un point commun majeur entre les SPI1 et SPI2 est la présence de gènes codant pour un système de sécrétion de type III (tss pour « type three secretion system »). Ces systèmes sont composés d'un arrangement de plus de 20 protéines toutes codées dans le SPI et permettent d'interagir avec l'environnement par l'envoi des protéines effectrices. Non seulement le système permet aux protéines effectrices de traverser les membranes interne

et externe de la bactérie, mais il permet leur injection directement dans la cellule cible. Pour cette raison, on a souvent décrit les ttss comme des seringues macromoléculaires ou des aiguilles (40, 105). Les protéines effectrices qui sont délivrées par les ttss sont soumises à une régulation très précise. Seul un environnement spécifique entraînera leur sécrétion. Des protéines chaperonnes leur sont associées pour protéger la conformation, éviter la dégradation et prévenir l'association prématurée (116).

Le SPI1 contient des gènes qui sont, pour la plupart, impliqués dans la pénétration de la barrière épithéliale. Cet îlot comprend 29 gènes, dont les gènes *inv* responsables de l'assemblage du ttss, ceux codant pour les protéines effectrices et des gènes régulateurs. Les protéines effectrices sécrétées via le ttss du SPI1, codées par des gènes faisant partie ou non de l'îlot, permettent l'interaction avec les cellules épithéliales. Cette spécialisation avait été mise en évidence avec des mutants des gènes *invA* et *orgA* du SPI1 dont la virulence est atténuée avec une administration orale, mais non atténuée avec une administration systémique (57). Parmi les gènes codant pour des protéines effectrices les mieux caractérisés du SPI1, mentionnons les gènes *sipA*, *sipC* et *sptP*. SipA et SipC interagissent avec les filaments d'actine des cellules M permettant leur réarrangement et l'engouffrement de la bactérie (118, 180, 181). Le gène *sopE*, présent dans une séquence homologue au phage P2 chez un nombre limité de sérotypes de *Salmonella*, se retrouve en dehors du SPI1, mais participe lui aussi au changement de conformation des cellules épithéliales. La protéine SopE, en agissant comme un échangeur de nucléotides GDP/GTP dans les Rho GTPases comme Rac-1 et CDC42 induirait une cascade signalétique menant au réarrangement de l'actine dans les cellules M (87). SptP qui agit également au niveau de l'actine, serait impliquée dans la restauration de la forme initiale de la cellule après l'internalisation du pathogène (54). Plus précisément, SptP serait l'antagoniste de SopE puisqu'elle agit comme une protéine GAP (GTPase-activating protein) sur les Rho GTPases Rac-1 et CDC42 (55). Quant à la protéine effectrice SipB, codée dans le SPI5, mais sécrétée par le ttss du SPI1, elle est responsable de l'activation de la caspase-1 menant à l'apoptose des macrophages, tel qu'abordé plus haut (122).

À la différence du SPI1 qui est responsable principalement de l'envahissement des cellules épithéliales, le SPI2 comporte surtout des gènes de virulence impliqués dans la survie à l'intérieur du macrophage. Tout comme pour le SPI1, ce sont des mutants déficients du SPI2 qui auront permis de déterminer le lieu d'action des gènes du SPI2. *In vitro*, les mutants du SPI2 n'atteignent pas le même niveau de répllication dans les macrophages que les souches originelles et *in vivo*, les mutants du SPI2 sont capables de coloniser les plaques de Peyer, mais n'atteignent pas les ganglions et n'établissent pas de

foyers de réplication dans le foie et la rate (30, 91). Parmi les nombreux gènes du SPI2, au-delà de 40, on a identifié un deuxième ttss, un système de régulation à deux composantes et de nombreuses protéines effectrices et chaperonnes (90). Une protéine effectrice bien caractérisée passant par le ttss du SPI2 est la protéine SifA. Décrite originalement comme un facteur essentiel à la production des filaments induits par *Salmonella*, on a montré récemment son action dépend du ttss du SPI2 (20, 151). Les protéines effectrices SseC et SseD, nécessaires pour la virulence et l'infection systémique, sont transportées par le ttss et se retrouvent exposées à l'environnement du phagosome en demeurant légèrement associées à la membrane (104). Les gènes du SPI2 sont sous le contrôle du système à deux composantes PhoP/PhoQ.

1.4.3. Les gènes de virulence incluent des transporteurs de métaux divalents

Tous les gènes de virulence des îlots de pathogénicité de *S. typhimurium* ne sont pas liés aux ttss. Le SPI3 comporte deux gènes essentiels à la virulence chez la souris et pour la réplication dans le macrophage qui sont des transporteurs de métaux. (16, 17). Les gènes *mgtBC* permettraient l'acquisition du magnésium lorsque le milieu en est appauvri. Les deux gènes sont sous le contrôle du système PhoP/PhoQ tout comme le SPI2. Les gènes *mgtBC* constituent un premier exemple de gènes de virulence qui codent pour des transporteurs de métaux. *Salmonella* possède aussi l'opéron *sitABCD* qui fait partie du SPI1 et représente un homologue du système de transport de fer et de manganèse requis comme un facteur de virulence chez *Yersinia* (voir 4.2.3).

1.4.4. Régulation : Hila et PhoP/PhoQ

De nombreux gènes de virulence chez *Salmonella* ont été acquis par transfert horizontal : gènes des îlots et des îlets de pathogénicité, gènes portés par des séquences homologues à des phages et gènes portés par le plasmide. L'intégration de la régulation de ces facteurs de virulence à la régulation globale de l'organisme a pu représenter tout un défi pour le pathogène au cours de l'évolution. Les gènes peuvent être sous le contrôle de gènes qui ont été aussi acquis par transfert horizontal, comme *hila* du SPI1 ou, alternativement, être sous le contrôle de gènes de régulation depuis longtemps intégrés au génome. Le plus bel exemple est celui du système de régulation à deux composantes PhoP/PhoQ qui se situe au sommet de la régulation de la virulence chez *Salmonella*. Les gènes *phoP* et *phoQ* sont présents chez *E. coli* et servent à la régulation de gènes qui ne sont pas des gènes de virulence. Chez *Salmonella*, le régulon a été amené, au fil de l'évolution, à contrôler des facteurs de virulence acquis par transfert horizontal. Souvent, un système de régulation

global contrôle l'activation d'un système de régulation acquis conjointement avec un groupe de gènes de virulence. Le contrôle par PhoP/PhoQ du système PmrA/PmrB du SPI2 en est un bel exemple.

La protéine membranaire PhoQ répond aux concentrations extracellulaires de Mg^{2+} et de Ca^{2+} (61). En présence d'une concentration élevée de ces ions, comme dans les espaces extracellulaires, le système est inactif. Lorsque ces ions sont rares, comme à l'intérieur des cellules, le système est activé. PhoQ agit donc comme une sonde qui informe la bactérie si elle se trouve en condition extracellulaire ou intracellulaire. La protéine cytoplasmique PhoP, est un facteur de transcription qui, lorsque phosphorylée, régule positivement les *pag* (« PhoP-activated genes ») et négativement les *prg* (« PhoP-repressed genes »). Un taux élevé de Mg^{2+} amène la déphosphorylation par PhoQ de PhoP qui n'est alors plus active (27). La protéine PhoP est essentielle à la virulence (70, 71, 119).

Parmi les *prg*, mentionnons les gènes de SPI1 codant pour le ttss de même que des gènes codant pour des protéines effectrices. Ces gènes nécessaires à la colonisation des cellules épithéliales sont impliqués à un moment où les bactéries sont encore à l'extérieur des cellules. Le système PhoP/PhoQ est alors inactif et les *prg* ne sont plus réprimés. C'est alors l'oxygène et l'osmolarité qui vont déterminer l'expression de ces gènes. Parmi les protéines codées dans le SPI1, HilA va jouer un rôle majeur dans la régulation (8, 9). Une faible concentration en oxygène, une osmolarité élevée et un pH alcalin, toutes de conditions qui sont caractéristiques de la lumière intestinale, vont amener la transcription de *hilA*. Le facteur HilA active la transcription de gènes SPI1, ceux du ttss et celui du facteur de régulation InvF. InvF induit les gènes codant pour les protéines effectrices du ttss du SPI1, qu'ils soient à l'intérieur de l'îlot ou à l'extérieur comme *sopB* et *sopE*. Les gènes du SPI4 seraient aussi sous le contrôle de InvF et de HilA (4). Lorsque le système PhoP/PhoQ est actif, *hilA* est réprimé (9).

Les *pag* sont impliqués dans la virulence intracellulaire principalement au niveau du macrophage. Ils incluent les gènes du SPI2 dont on a mentionné plus haut l'importance pour la survie intracellulaire (30, 91). Comme on l'a vu, les gènes *mgtBC* du SPI3 qui permettent le transport du magnésium, ainsi que le gène *pagP* de résistance aux peptides antibactériens sont régulés positivement par PhoP/PhoQ. PhoP/PhoQ contrôle également l'activation de la protéine intracellulaire PmrA du système PmrA/PmrB. Ce système répond également au Fe^{3+} extracellulaire et régule positivement les gènes *pbgP*, *pbgE*, *pmrE*, *pmrF*, *pmrG* et *pagP* tous impliqués dans la modification des LPS (70). On a proposé l'hypothèse que les protéines PbgE et PbgP en se liant aux LPS et en les

stabilisant, permettraient de libérer les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} des LPS pour approvisionner la cellule à un stade de l'infection où l'environnement ne peut en fournir suffisamment (72). Outre PmrA/PmrB, un deuxième système à deux composantes, soit le système SsrA/SsrB, est sous le contrôle de PhoP/PhoQ et participe à la régulation des gènes du SPI2 (38). D'autres gènes sous le contrôle de PhoP/PhoQ sont les gènes *spv* portés sur le plasmide de *Salmonella* dont on a l'implication dans la survie à l'intérieur du macrophage (80). Le produit du gène *spvB* est une enzyme d'ADP-ribosylation qui utilise l'actine comme substrat et qui déstabiliserait le cytosquelette des cellules en dépolymérisant les filaments d'actine (109).

Lors du stade de réplication intracellulaire dans le macrophage, s'ajoute à la régulation par PhoP/PhoQ, une régulation dépendante du gène *rpoS* (28). Le produit du gène est un facteur sigma alternatif pour l'ARN polymérase σ^S qui, par la transcription de gènes spécifiques, engendre une réponse globale au stress commune aux bactéries Gram négatives (77). Le facteur σ^S est nécessaire à l'expression des gènes *spv* du plasmide de *S. typhimurium* (44).

La complexité de la régulation des gènes de virulence chez *Salmonella* est telle que de nombreuses questions restent encore en suspens, malgré les percées importantes des dernières années. Cette complexité demeure néanmoins la meilleure illustration du défi immense relevé par le pathogène d'intégrer à la régulation d'un organisme, une multitude de facteurs acquis horizontalement au fil de l'évolution.

2. L'hôte : la défense

2.1. La défense globale : le système immunitaire et la réponse à *S. typhimurium*

Le modèle d'infection de la souris par *S. typhimurium* a l'avantage d'inclure à la fois l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée est cruciale dès le début de l'infection et consiste en la réponse des phagocytes professionnels, macrophages et polymorphonucléaires. L'immunité acquise repose principalement sur les cellules T CD4+, ainsi que sur les cellules T CD8+ et deux classes atypiques de cellules T, les $\gamma\delta$ et celles présentant un récepteur limité aux molécules CMH de classe Ib. Un rôle pour les cellules B a également été démontré (120)

Le fait que *S. typhimurium* colonise les phagocytes et y tire avantage pour sa multiplication n'implique pas que les phagocytes ne jouent pas de rôle dans la défense de

l'organisme. Il a été mentionné plus haut que la rencontre entre le pathogène et le phagocyte pouvait trouver trois issues : la destruction du pathogène par le phagocyte, la survie et la multiplication bactérienne intracellulaire et l'apoptose de la cellule induite par le pathogène. La première issue, dépendante de l'activation du macrophage, permet à son tour l'activation et le recrutement d'autres phagocytes et permet ainsi de limiter dans une certaine mesure l'invasion de *Salmonella*. Cette destruction du pathogène par le phagocyte n'est rendue possible qu'en réponse à L'IFN- γ et au TNF- α (79, 127). La réponse inflammatoire générée très tôt en réponse aux LPS permet l'expression de cytokines inflammatoires, dont le TNF- α , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-12 (41, 98). Quant à l'IFN γ , sa production est assurée dès le début de l'infection par les cellules NK (141).

Les prochaines sections seront consacrées à la résistance de l'hôte et aux mécanismes utilisés par les phagocytes professionnels pour détruire les bactéries internalisées. Aux moyens utilisés par l'hôte pour limiter l'infection, seront opposés les réponses développées par les pathogènes pour empêcher leur élimination. L'évolution du phagosome vers le phagolysosome, le stress oxydatif et la protéine Nramp1 seront les sujets traités.

2.2. La maturation du phagosome : de l'internalisation au phagolysosome

La destruction des microorganismes internalisés par les phagocytes professionnels, macrophages et polymorphonucléaires, repose sur le processus hautement régulé de maturation du phagosome. Le processus permet de modifier la vésicule initialement formée lors de l'engouffrement du microorganismes en une vésicule au contenu toxique où aucune survie n'est alors possible. L'évolution des pathogènes se faisant de concert avec celle de l'hôte, des pathogènes qui, comme *Salmonella*, utilisent le macrophage pour se répliquer, se sont adaptés et sont capables de perturber la maturation du phagosome.

2.2.1. Le processus normal de maturation du phagosome

La première étape de la maturation du phagosome consiste en la fusion avec les endosomes précoces. Cette étape est régulée par la GTPase Rab5, qui dans sa forme active liée au GTP, est nécessaire à la fusion. On détecte alors au niveau du phagosome des marqueurs caractéristiques des endosomes précoces que sont le récepteur au mannose et l' α -adaptin. Puis, au fil des événements de fusion et de fission, ces marqueurs disparaissent et sont remplacés par des marqueurs des endosomes tardifs comme la glycoprotéine lamp1 (lysosomal membrane-associated protein-1), les pompes à proton de

type vacuolaire (V-ATPases) et le récepteur au mannose-6-phosphate. L'accumulation progressive des V-ATPases amène une baisse du pH dans la vésicule. Alors que le pH se situe à environ 6.0 dans un phagosome précoce, il peut atteindre de 4.0 à 5.5 dans un phagosome tardif. La disparition progressive des pompes Na^+/K^+ -ATPase pourrait également faciliter le maintien d'un pH faible. À cette étape s'ajoute l'acquisition des molécules qui permettront de générer le stress oxydatif. Dans les phagosomes tardifs, on observe aussi la présence d'enzymes hydrolytiques comme la cathepsin-D et de petites GTPases comme Rab7. Rab7 permet la dernière étape qui est la transformation du phagosome tardif en phagolysosome suite à la fusion avec les lysosomes (5).

Le processus de maturation du phagosome peut être bloqué à l'une ou l'autre de ces étapes par l'intervention des pathogènes. Dans tous les cas étudiés, l'arrêt de la maturation nécessite que le pathogène soit vivant, illustrant ainsi un processus actif. Avec *Legionella pneumophila*, il semble que la maturation arrête dès l'étape de fusion avec les endosomes précoces puisque ni les marqueurs des endosomes ni les marqueurs des lysosomes ne peuvent être détectés (60). Le phagosome de *Mycobacterium* franchit cette étape, mais la fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes est empêchée (154). Le phagosome demeure alors bloqué à une étape intermédiaire entre celles régulées par Rab5 et Rab7 puisque le phagosome montre l'accumulation de Rab5, mais aucune trace de Rab7 (172). L'appauvrissement en V-ATPases qui en résulte empêche l'acidification normale du phagosome permettant la survie du pathogène (155). Le pH du phagosome de *M. bovis* est affecté par la présence de la protéine Nramp1, impliquée dans la résistance à des pathogènes intracellulaires (86). L'utilisation d'un mutant de *Listeria monocytogenes* négatif pour l'hémolysine a permis de montrer que *Listeria* peut bloquer la maturation de son phagosome un peu plus tardivement que *Mycobacterium* puisque l'on voit l'accumulation à la fois de Rab5 et de Rab7. Par contre, la fusion avec les endosomes tardifs qui amène les marqueurs lamp1 et le récepteur au mannose-6-phosphate, est empêchée (6).

2.2.2. Le phagosome de *Salmonella*

Il est difficile de définir avec *S. typhimurium* comme avec les pathogènes décrits ci-haut une étape précise où la maturation du phagosome reste bloquée. Néanmoins, parmi les pathogènes mentionnés, *Salmonella* est celui où la maturation du phagosome va le plus loin. Il y aurait fusion, mais d'une façon limitée, avec le réseau endocytique. Une controverse a d'ailleurs longtemps existé à savoir si le phagosome fusionnait ou non avec les lysosomes. On observe la présence de glycoprotéines lysosomales et de phosphatases

du lysosome, mais l'absence du récepteur au mannose-6-phosphate et de la forme active de la cathepsin-D (59, 142). Il semblerait que la fusion avec les lysosomes soit empêchée et que l'acquisition des glycoprotéines lysosomales dépende d'un processus indépendant (88). L'acidification n'est pas altérée comme chez *Mycobacterium* puisque le pH du phagosome de *Salmonella* atteint un pH compris entre 4.0 et 5.0 que la bactérie soit vivante ou non (143). Quant à la fusion avec les endosomes précoces, non seulement elle ne serait pas empêchée, mais elle serait favorisée par l'accumulation de la GTPase Rab5 (126). Cette possibilité pour *Salmonella* d'interférer avec le processus normal de maturation du phagosome peut toutefois être limitée par des facteurs de l'hôte. En effet, des expériences récentes ont permis de montrer que la protéine Nramp1 intervient dans le processus d'adaptation du phagosome par *Salmonella* en permettant des événements de fusion bloqués en l'absence de Nramp1 (35).

L'évolution différente des phagosomes contenant des salmonelles vivantes ou tuées indique un processus actif d'interaction entre le pathogène et le phagocyte. Des études récentes ont montré l'implication de la protéine SopE de *S. typhimurium* dans la promotion de la forme active liée au GTP de Rab5 (125). La protéine SopE, codée dans une séquence homologue au phage P2, avait déjà été associée à l'activation d'échangeurs de nucléotides GDP/GTP au niveau des cellules M. Une autre protéine de *S. typhimurium* impliquée dans l'arrêt de la maturation du phagosome est la protéine SpiC. La présence d'une protéine SpiC fonctionnelle est nécessaire pour bloquer la fusion avec les lysosomes et on a montré *in vitro* que la protéine purifiée empêchait la fusion d'endosomes (164). Une souche déficiente pour *spiC* perd sa virulence, démontrant toute l'importance de l'inhibition du trafic cellulaire.

2.3. La défense liée à l'O₂ et au N₂

2.3.1. La production de radicaux oxygénés et azotés

On regroupe sous l'appellation de stress oxydatif les effets causés par les intermédiaires hautement réactifs de l'oxygène, soit l'anion superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le radical hydroxyl (HO·). À ces réactifs, on ajoute l'oxyde nitrique (NO·), l'acide hypochlorique (HOCl) et le peroxydinitrite (HOONO) puisque la réactivité de ces molécules s'apparente à celle des intermédiaires de l'oxygène (153). En milieu aérobie, les bactéries sont constamment exposées au stress oxydatif, car plusieurs de ces réactifs sont en fait des sous-produits de la chaîne de transport des électrons (66, 93). En particulier, la fumarate réductase, une des protéines oxydase de la chaîne, réagit très

rapidement à l'oxygène et représente une source importante de stress oxydatif (92). Pour limiter les conséquences négatives de la respiration aérobie, les bactéries disposent, comme il sera discuté plus loin, d'enzymes permettant d'en limiter les effets toxiques. Or, dans le phagosome, la quantité de ces radicaux est telle que la résistance au stress oxydatif devient un enjeu majeur pour le pathogène. La présence de tous ces radicaux est due à la NADPH phagocyte oxydase et à la iNOS (« inducible nitric oxide synthase ») deux enzymes du macrophage qui génèrent respectivement l' $O_2\cdot^-$ et le $NO\cdot$ (168). La NADPH oxydase génère l'anion superoxyde par la réduction de l'oxygène alors que le $NO\cdot$ produit par la iNOS provient de l'oxydation de la L-arginine. Les substrats des deux enzymes comprennent l'oxygène et le NADPH qui, par son oxydation (NADPH en $NADP^+$), fournit l'énergie à la réaction. L'anion superoxyde amène la présence de peroxyde et le $NO\cdot$ de NO_2 , fournissant ainsi un cocktail à l'action destructrice puissante.

2.3.2. Les mécanismes d'action sur les bactéries

C'est l'étude de mutants pour les enzymes protectrices qui a permis d'élucider la nature des dommages engendrés par le stress oxydatif. Une perte d'activité a été montrée chez une famille de déshydratases. Le site actif de ces enzymes comprend un centre Fer-Soufre (4Fe-4S) qui, oxydé par l' $O_2\cdot^-$ (3Fe-4S), s'en trouve inactivé (52). Le même phénomène est observé avec les enzymes fumarase et aconitase. Au dommage causé par l'inactivation de ces enzymes, s'ajoute alors le relargage dans la cellule d'ions Fe^{2+} . Comme il sera traité plus loin, le Fe^{2+} , par la réaction de Fenton, réagit avec le peroxyde d'hydrogène pour générer le radical hydroxyl ($OH\cdot$). Le radical hydroxyl ainsi généré peut endommager directement l'ADN (101). Le peroxyde d'hydrogène, en plus d'être impliqué dans les réactions de Fenton, cause aussi des dommages directement comme l'oxydation des résidus cystéines qui constituent le site actif d'enzymes telle la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogenase. Pour ce qui est des résidus azotés, le $NO\cdot$ est responsable de l'inhibition de la cytochrome oxydase et de l'aconitase. La destruction du centre Fer-Soufre de l'aconitase augmente alors le pool d'ions ferreux disponible. Le peroxyde nitrite, tout comme l' $O_2\cdot^-$ inhibe les déshydratases en plus de causer directement l'oxydation de l'ADN (153).

2.3.3. La défense bactérienne contre les radicaux oxygénés et azotés

L'étude des mécanismes de défense contre le stress oxydatif menée chez *E. coli* a permis d'élucider les moyens utilisés par les bactéries pour limiter les effets des radicaux oxygénés et azotés tout en bénéficiant du haut rendement énergétique de la respiration

aérobie. La présence d'une quantité élevée d' $O_2^{\cdot-}$ et de peroxyde induit l'expression de plusieurs gènes de défense contre le stress oxydatif. La régulation de ces gènes repose sur les facteurs SoxR/SoxS et OxyR (153). Le système SoxR/SoxS est composé d'une protéine répondant à l'anion superoxyde, SoxR et d'un facteur de transcription, SoxS. Le centre actif de la protéine SoxR qui répond à l' $O_2^{\cdot-}$ est constitué d'un centre Fer-Soufre alors que le centre actif du facteur OxyR, qui répond au peroxyde, est fait de résidus cystéine. Ainsi, la réponse de l'organisme est enclenchée au même moment où les effets toxiques sont perçus. Parmi les gènes régulés par SoxR/SoxS et OxyR chez *E. coli*, il y a des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, des gènes codant pour des formes résistantes à l' $O_2^{\cdot-}$ de la fumarase et de l'aconitase ainsi que le gène *sodA* codant pour la Mn-superoxyde dismutase (153). Chez *Salmonella*, on remarque quelques différences quant à la régulation de la réponse au stress. Les gènes *fpr* et *ydbK*, codant respectivement pour la Mn-superoxyde dismutase, la NADPH ferredoxine reductase et, par prédiction de séquence, une réductase contenant un centre Fe-Soufre, ont été identifiés comme répondant à SoxS chez *Salmonella* (134).

Parmi les gènes induits en réponse au stress oxydatif, certains codent pour des enzymes responsables de la neutralisation directe des radicaux comme les gènes *katE* et *katG* codant pour des catalases et le gène *sodA* de la Mn-superoxyde dismutase. *Salmonella* compte deux autres types de superoxyde dismutases, codées par les gènes *sodB* et *sodC*, qui ne répondent pas à SoxS. Au niveau du phagosome, ces enzymes de résistance au stress oxydatif contribuent à la survie du pathogène. La protection conférée notamment par la Mn-superoxyde dismutase permet la survie de *Salmonella* à l'intérieur du macrophage (161). La fonctionnalité des catalases et des superoxyde dismutases étant dépendante des métaux, leur discussion est incluse dans la prochaine partie.

Un moyen alternatif de protection face aux dommages causés par l'anion superoxyde et indépendant de SoxR a été montré récemment chez *S. typhimurium*. Une mutation ponctuelle entraînant la surexpression de la protéine YggX permet l'augmentation de la résistance au paraquat, diminue la fréquence des mutations spontanées et renverse la sensibilité d'une souche *gdhA* où les centres Fer-Soufre sont possiblement altérés (69). Un modèle où YggX empêcherait l'oxydation des centres Fer-Soufre d'enzymes telles l'aconitase a été suggéré.

2.3.4. La NADPH oxydase et la iNOS et l'interaction avec *S. typhimurium*

L'importance de la NADPH oxydase des phagocytes dans la lutte à l'infection par *Salmonella* est illustrée chez les patients atteints de « chronic granulomatous disease » (CGD). Cette maladie apparaît lorsque l'un des gènes codant pour les composantes de la NADPH phagocyte oxydase porte une mutation qui empêche l'activité de l'enzyme. Les gens atteints ont une plus grande susceptibilité aux infections bactériennes et fongiques et à *Salmonella* en particulier qui est la deuxième cause des infections diagnostiquées (124). Un modèle animal de la CDG a été fourni avec la découverte d'une lignée de souris portant une mutation dans le gène *gp91phox*, codant pour une sous-unité de la NADPH phagocyte oxydase (133). Une plus grande présence bactérienne est observable chez ces souris dès le premier jour de l'infection et toutes les souris trouvent la mort à l'intérieur du période de cinq jours (117). Le contrôle de la multiplication de *S. typhimurium* dans le macrophage a aussi été démontré *in vitro* comme dépendant de la NADPH phagocyte oxydase (170). Les mêmes équipes ont également illustré l'importance de la iNOS dans le contrôle de l'infection par *Salmonella* *in vivo* et *in vitro* (117, 170). Les actions des deux enzymes seraient plus séquentielles que simultanées. La flambée respiratoire induite par la NADPH phagocyte oxydase, de courte durée, est suivie par une production intensive de NO \cdot (168).

La résistance de *Salmonella* aux effets dommageables de la NADPH phagocyte oxydase et de la iNOS ne peut être expliquée seulement par l'activation des mécanismes traditionnels de résistance au stress oxydatif. En effet, les protéines OxyR et SoxR/SoxS qui contrôlent la réponse ne sont pas nécessaires à la virulence de *Salmonella* (45, 158). C'est la découverte de la restauration de la virulence de souches atténuées chez des souris *phox*^{-/-} qui a permis de réorienter les recherches. Quatre souches déficientes pour les gènes *ssrA*, *ssaJ*, *ssaV* et *sseB* du SPI2 ont été trouvées atténuées dans les souris C57BL/6, mais virulentes dans les souris C57BL/6 *phox*^{-/-} (171). La localisation de la NADPH phagocyte oxydase au phagosome de *Salmonella* n'étant possible que chez les mutants du *ttss* du SPI2, dans les macrophages de souris comme dans les macrophages humains, ceci suggère une interaction des protéines sécrétées qui nuirait à l'assemblage d'une enzyme fonctionnelle au phagosome (58, 171).

2.4. La résistance conférée par le gène *Nramp1*

2.4.1. La découverte et la caractérisation de *Nramp1*

Tel que mentionné plus haut, le gène murin *Nramp1*, originalement le locus *Ity/Lsh/Bcg*, est impliqué dans la résistance à des pathogènes intracellulaires du macrophage. Le clonage positionnel a permis d'identifier un gène fortement exprimé dans le foie et la rate et dont l'ARNm pouvait être détecté dans les macrophages isolés à partir de ces organes. Le gène a été nommé *Nramp1* pour « natural resistance associated macrophage protein » (173). Son expression est limitée aux phagocytes professionnels. Le gène code pour une glycoprotéine membranaire dont les prédictions structurales basées sur l'analyse des séquences donnent 12 segments transmembranaires (174). Le phénotype de susceptibilité aux infections observé chez les souris a été relié à une mutation ponctuelle qui provoque la substitution d'une glycine pour un résidu aspartate à l'acide aminé 169 (115). La mutation G169D empêche la détection de la protéine qui est vraisemblablement dégradée rapidement. La protéine *Nramp1* est détectable dans les endosomes tardifs identifiés par la présence du marqueur *lamp1*. En situation d'infection, la protéine colocalise au phagosome, que la bactérie soit vivante ou non, tel qu'observé avec *Salmonella* et *Yersinia* (68, 76).

Très tôt, le gène *Nramp1* de la souris a été associé à la résistance à des pathogènes intracellulaires du macrophage. Chez l'humain un lien semblable a pu être établi, mais seulement dans certaines populations. Une première association a été montrée dans une population du sud du Viêt-Nam entre certains allèles du gène *NRAMP1* et la susceptibilité à la lèpre, une maladie attribuable à la bactérie *Mycobacterium leprae* qui est un pathogène intracellulaire du macrophage (2). Dans une population d'Afrique de l'Ouest, c'est une susceptibilité à la tuberculose, soit le pathogène *Mycobacterium tuberculosis*, qui a été corrélée à certains allèles de *NRAMP1* (14).

2.4.2. La fonction de *Nramp1* : prédiction et démonstration

C'est la caractérisation chez la souris d'une deuxième protéine *Nramp* homologue (78% de similarité, 64% d'identité), *Nramp2*, qui a suggéré le mécanisme d'action de *Nramp1*. L'expression du gène *Nramp2*, contrairement à celle de *Nramp1*, est ubiquitaire et la protéine est impliquée dans le transport du fer à la fois de façon dépendante et indépendante de la transferrine (22, 75). La mutation ponctuelle G185R dans *Nramp2* cause une anémie microcytique chez deux lignées murines (rat Belgrade et souris mk), le transport du fer étant alors déficient (50, 51). L'expression de *Nramp2* dans des oocytes

de *Xenopus* a permis de montrer le co-transport de protons et de certains cations divalents, dont le manganèse et le fer (83). Des homologues aux gènes *Nramp* ont été identifiés chez d'autres espèces comme la levure, la drosophile et certaines plantes et leur caractérisation subséquente a encore une fois permis de relier cette famille de protéines au transport des cations divalents (25). La levure *Saccharomyces cerevisiae* compte trois gènes homologues à *Nramp*, SMF1, SMF2 et SMF3, impliqués dans le transport du manganèse et du fer (29, 135, 156). La mutation dans l'homologue *mal* (malvolio) chez la mouche *Drosophila melanogaster* cause un défaut du goût qui peut être renversé par ajout de fer et de manganèse (129). La plante *Arabidopsis thaliana* compte 6 gènes *Nramp* dont au moins trois ont déjà été reliés au contrôle du fer (36, 159). À ces résultats obtenus chez les eucaryotes s'ajoutent ceux des procaryotes qui seront présentés plus loin.

Ainsi, par homologie à *Nramp2*, on a proposé pour *Nramp1* un rôle dans le transport de cations divalents du phagosome vers le cytoplasme du macrophage. Ce modèle respecte le co-transport de protons dans le sens du gradient puisque le phagosome, plus acide, contient nécessairement une réserve plus grande de protons que le cytoplasme. En appauvrissant ainsi le phagosome, le macrophage priverait le pathogène des cations essentiels à sa croissance et à la détoxification des radicaux oxygénés et azotés. Un premier lien entre *Nramp1* et le transport du fer a été fait suite à des expériences d'injection de fer *in vivo*. Ces expériences auront montré que la croissance de *Mycobacterium avium* est augmentée de façon dose-dépendante en réponse à la quantité de fer ajoutée et que l'avantage conféré par l'allèle résistant *Nramp1G169* s'en trouve alors de plus en plus réduit par rapport à l'allèle sensible *Nramp1D169* (65).

Une hypothèse contraire sur la fonction de *Nramp1*, est aussi par Zwilling et ses collaborateurs. Des expériences montrant un effet limitant du fer sur la croissance de *Mycobacterium avium* ont servi de base à un nouveau modèle où *Nramp1* transporterait le fer dans le phagosome (182). Le transport a été montré par une plus grande association de ^{55}Fe au phagosomes des cellules exprimant l'allèle *Nramp1G169* (106, 107). Dans le modèle alternatif le fer amené par *Nramp1* dans le phagosome contribuerait au stress oxydatif en générant le radical hydroxyl par la réaction de Fenton, une réaction qui sera traitée en détail plus loin. L'augmentation de l'anion superoxyde en même temps que la phagocytose de *Mycobacterium avium* qui a été remarquée seulement chez les cellules transfectées *Nramp1G169* a permis d'appuyer le modèle (106).

Les opposants au modèle défendu par Zwillig et ses collaborateurs et teneurs d'un transport hors du phagosome ont proposé maintes critiques aux travaux (53). Tout d'abord, il est souligné que les expériences d'association du ^{55}Fe au phagosome ne permettent pas de distinguer le simple attachement d'un réel transport. Ils soulignent aussi le paradoxe qui prévaudrait si le fer, un élément reconnu comme facteur de croissance de *Mycobacterium* et de d'autres pathogènes, faisait en même temps partie d'une défense antibactérienne. Enfin, la plus grande interrogation vient de la grande homologie entre Nramp1 et Nramp2, car il est difficile de croire que des protéines aussi semblables fonctionnent de façon fondamentalement opposée. Nramp2 est un co-transporteur de protons et de cations divalents et il faudrait, pour faire entrer le fer dans le phagosome, que Nramp1 soit un antiporteur.

Ce n'est que dernièrement que le transport de manganèse à l'extérieur du phagosome a été démontré (94). La méthode développée utilise la sonde Fura-6-FF-triethylester dont l'émission de fluorescence diminue en présence de cations divalents. Couplée à une particule de zymosan, elle est soumise à la phagocytose par des macrophages péritonéaux exprimant ou non Nramp1. Le manganèse a été ajouté et son entrée dans la cellule a été facilitée par l'ajout conjoint de thapsigargin. Cette molécule, en inhibant les ATPases, induit le relargage du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique et permet ainsi l'ouverture des canaux calciques membranaires. L'émission de la sonde est ensuite mesurée *in situ* à l'aide d'un système d'imagerie digitale. La fluorescence n'est pas atténuée dans les macrophages exprimant *Nramp1*, ce qui suggère un efflux de manganèse hors du phagosome dû à l'action de Nramp1.

3. Importance des métaux divalents fer et manganèse lors de l'infection

3.1. Le fer : propriétés et réaction de Fenton

L'utilisation du fer par les microorganismes est extrêmement répandue. Seuls quelques membres du genre *Lactobacillus* et le pathogène *Borrelia burgdorferi* ne montrent pas de dépendance face au fer (21, 136). L'intérêt métabolique du fer, pour les microorganismes comme pour les eucaryotes, réside dans sa grande réactivité. Le fer peut en effet prendre deux états stables, soit l'état ferrique Fe^{3+} et l'état ferreux Fe^{2+} . Le passage de l'une à l'autre de ces formes dans le cadre bien précis d'une réaction enzymatique permet de catalyser nombre de réactions biochimiques. Des protéines comportant des ions de fer sont impliquées notamment dans des fonctions aussi importantes que la chaîne de transport des électrons et le transport de l'oxygène.

Si la grande réactivité du fer procure à la cellule plusieurs avantages, il faut aussi dire que le prix à payer pour cette réactivité peut être élevé en aérobiose. Des réactions impliquant le fer génèrent des produits hautement toxiques qui, s'ils ne sont pas contrôlés, mènent à la mort de la cellule. On regroupe ces effets négatifs du fer en présence d'oxygène sous l'appellation de chimie de Fenton. Le Fe^{2+} , en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène, génère le radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$) une molécule hautement toxique capable d'attaquer directement l'ADN ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$). Les réactifs, Fe^{2+} et peroxyde, sont eux-mêmes générés par la réaction d'anions superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$ avec des protons ($2\text{O}_2\cdot^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) et par l'oxydation du NADH ($\text{Fe}^{3+} + \text{NADH} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{NADH}^+$) respectivement (21). Pour bénéficier des avantages du fer sans être affectées par la réaction de Fenton, les cellules doivent contrôler l'état du fer intracellulaire et aussi être en mesure de limiter ses conséquences négatives. Paradoxalement, comme il sera élaboré plus loin, une partie de la réponse antioxydante de la bactérie est dépendante du fer.

La grande réactivité du fer en fait un élément de première importance, qui par la respiration aérobie permet à une cellule d'obtenir le meilleur rendement énergétique possible. Cependant, ce rendement ne pourrait être atteint sans maintenir une régulation coordonnée et très stricte des systèmes d'acquisition, de stockage des métaux et de détoxification des radicaux. La régulation de l'acquisition du fer chez *Salmonella* et *E. coli* se fait par l'intermédiaire du répresseur Fur et un mutant *fur* chez *E. coli* montre une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène (160). Le stockage intracellulaire du fer dépend de la ferritine, une molécule retrouvée chez les bactéries comme chez les vertébrés. Un mutant de *Campylobacter jejuni* incapable de synthétiser la ferritine montre aussi une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène (176).

Un autre prix métabolique à payer pour l'utilisation du fer est le maintien de systèmes d'acquisition. Le Fe^{2+} est capable de traverser la membrane externe par diffusion à travers les pores, mais nécessite un transporteur pour gagner l'accès au cytoplasme. Cet état du fer n'est toutefois disponible que dans certaines conditions. En aérobiose, à un pH prêt de la neutralité, le fer se retrouve sous sa forme ferrique Fe^{3+} qui est insoluble et précipite. Le Fe^{3+} , à la différence du Fe^{2+} , ne peut pas traverser la membrane externe des bactéries. Ces dernières doivent donc, pour assimiler le fer, être capables de le transporter et de le solubiliser. En outre, le fer est très rarement retrouvé à l'état libre dans l'environnement. Dans l'hôte, on le retrouve plutôt complexé à des molécules comme l'hémoglobine, la transferrine, la lactoferrine et les protéines avec groupement hème et les bactéries doivent synthétiser des molécules capables de fixer ces protéines pour en libérer le fer lié et l'assimiler. Toutes ces formes que peut prendre le fer obligent les

bactéries à être pourvues de moyens d'acquisition variés pour couvrir tous les états du fer. Les différents systèmes d'acquisition du fer de *Salmonella* font l'objet d'une description approfondie plus loin.

3.2. Le manganèse : propriétés

On retrouve principalement le manganèse sous une forme Mn^{2+} . Néanmoins, le manganèse peut se retrouver dans dix autres états d'oxydation. Ce pouvoir redox du manganèse permet son utilisation pour catalyser des réactions chimiques. La forme Mn^{3+} est défavorisée au profit des formes Mn^{2+} et Mn^{4+} qu'on retrouve dans la cellule en association sous forme de sulfates, de citrates et de chlorides. Par comparaison au fer, le manganèse est plus stable et s'oxyde plus lentement (24). Ceci en fait une molécule moins intéressante que le fer pour le rendement énergétique, mais moins dangereuse. Contrairement au fer, le manganèse ne réagit pas avec le peroxyde pour faire la réaction de Fenton.

La régulation de l'acquisition du manganèse repose chez plusieurs espèces sur une protéine de la famille DtxR, comme l'ont montré les premières études chez *Treponema pallidum*, *Bacillus subtilis* et *Streptococcus gordonii* (95, 137, 138). Récemment, le contrôle par MntR, un régulateur de la famille DtxR, du transporteur MntH a été montré chez *E. coli* (131). Comme nous le verrons plus loin, le gène *mntH* code chez *E. coli* et *S. typhimurium* pour un transporteur de manganèse à haute affinité.

3.3. Les métaux et la résistance au stress oxydatif

L'importance d'un système de défense contre le stress oxydatif a été soulignée déjà pour les bactéries vivant en milieu aérobie et aussi, plus particulièrement pour les pathogènes intracellulaires soumis à l'action de la NADPH phagocyte oxydase et de la iNOS. Les enzymes bactériennes impliquées dans la défense antioxydante utilisent les propriétés d'oxydo-réduction des cations divalents comme le fer et le manganèse. La superoxyde dismutase codée par *sodA* comporte à son site actif un ion de manganèse, celle codée par *sodB*, un ion de fer et celle par *sodC* un ion de cuivre et un ions de zinc.

L'implication du manganèse dans la détoxification des radicaux oxygénés est connue. Les propriétés oxydatives du manganèse permettent effectivement de renverser certaines des réactions qui génèrent le stress oxydatif. La conversion du peroxyde en eau et en oxygène est rendue possible soit directement par le Mn^{2+} présent dans les tampons carbonate, soit

par la Mn-catalase, soit par la Mn-peroxydase (24). La Mn-superoxyde dismutase accélère la conversion de l'anion superoxyde (O_2^-) en peroxyde et en oxygène. L'inactivation de *sodA* affecte la réplication intracellulaire dans les macrophages (161). La surexpression de *sodA* sur un plasmide permet, dans une souche *oxyR*, de diminuer la fréquence des mutations d'un facteur 5 (152).

En plus de SodB, plusieurs enzymes impliquées dans la défense au stress oxydatif possèdent un ion de fer dans leur centre actif. Ses propriétés permettent son utilisation comme le manganèse dans des protéines telles les superoxyde dismutases (SodB chez *Salmonella* et *E. coli*). Chez *E. coli*, l'étude de la structure des hydroxyperoxydases I et II (ou catalases), codées par les gènes *katG* et *katE* respectivement, a révélé la présence d'un groupement hème, dont la fonctionnalité repose sur l'ion fer, au site actif de l'enzyme. Les gènes *katG* et *katE* de *Salmonella* sont homologues à ceux de *E. coli* (157). De façon similaire à ce qui est observé avec *sodA*, la surexpression de *katG* sur un plasmide permet dans une souche *oxyR* de ramener la fréquence des mutations à ce qui est observable dans une souche sauvage (152).

À la différence de SodA et de SodB, la troisième superoxyde dismutase de *E. coli*, SodC, est une protéine sécrétée dans l'espace périplasmique, dont la fonctionnalité repose sur un centre cuivre-zinc. *Salmonella* possède plus d'un gène codant pour des Cu-Zn-superoxyde dismutases. SodCII est la plus homologue à celle de *E. coli* et peut-être la plus ancienne puisqu'on n'a pas montré que son gène était relié à des éléments génétiques mobiles. Par opposition le gène codant pour la SodCI est retrouvé dans la séquence d'un prophage, nommé Gifsy-2, et n'est retrouvé que chez les sérotypes les plus virulents (43, 48). Un autre phage, Fels-1, aurait amené la SodCIII (49). Une souche déficiente pour SodCII chez *Salmonella* a été montrée atténué *in vivo* et affectée quant à sa réplication dans les macrophages (37). Une autre équipe n'a pas vu de différence dans les macrophages, mais a montré une faible atténuation *in vivo*, et une sensibilité *in vitro* à l'anion superoxyde (46). Toutefois, on peut penser que la perte d'une Cu-Zn-superoxyde dismutase peut être compensée par les deux autres.

Comme l'anion superoxyde O_2^- ne peut traverser les membranes, il a été suggéré que les Cu-Zn-superoxyde dismutases membranaires limitent les dommages au niveau de la membrane et que les Mn-superoxyde dismutase et Fe-superoxyde dismutase cytoplasmiques protègent les enzymes de l'intérieur de la cellule. D'ailleurs chez *Legionella pneumophila*, la Fe-superoxyde dismutase ne peut pallier la perte de la Cu-Zn-superoxyde dismutase et vice-versa (148, 150). Les Cu-Zn-superoxyde dismutases

limiteraient donc les dommages en accaparant l'anion superoxyde et en limitant la formation du peroxydinitrite.

3.4. Les enjeux lors de l'infection

Ainsi, à la fois la croissance et la défense de l'organisme reposent sur l'accessibilité aux cations divalents comme le fer et le manganèse. Dans un endroit aussi pauvre en cations que le phagosome, la disponibilité de ces ions devient donc un enjeu pour le pathogène. Privé de fer et de manganèse, le microorganisme est en situation d'anémie et montre une sensibilité accrue au stress oxydatif. L'hôte, pour limiter la réplication intracellulaire, a donc tout intérêt à limiter la disponibilité des cations en appauvrissant son phagosome. La faible quantité d'ions peut alors être détectée par le pathogène et servir à l'activation de gènes de virulence. Le système à deux composantes PhoP/PhoQ de *Salmonella* décrit précédemment en est le meilleur exemple. La faible quantité de magnésium extracellulaire empêche PhoQ de déphosphoryler PhoP et PhoP est alors en mesure d'induire les *pags*. Chez *Vibrio cholerae* une faible quantité de fer amène l'expression de la protéine IrgA, démontrée essentielle à la virulence (64). L'expression de *irgA* est sous le contrôle de *irgB*, un gène présent tout juste en amont de *irgA*, mais dans l'orientation inverse, et dont l'expression est également inversement dépendante du fer. Les deux gènes possèdent une séquence de liaison pour le facteur Fur. Le modèle de régulation proposé veut que les deux gènes soient normalement réprimés, qu'en situation limitante en fer les deux gènes puissent être transcrits et qu'en plus la protéine IrgB régule positivement l'expression de *irgA* (63).

Une autre illustration de l'importance des cations divalents pour le pathogène vient de la présence des systèmes d'acquisition dans les îlots de pathogénicité. En effet, outre les transporteurs qui sont communs aux bactéries non-pathogènes, certains pathogènes ont hérité de systèmes d'acquisition supplémentaires par transfert horizontal de gènes. L'îlot de pathogénicité présent chez les souches virulentes du genre *Yersinia*, soit *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*, a été décrit comme un îlot voué à l'acquisition du fer parce qu'il contient les gènes nécessaires à la synthèse, la fonctionnalité et la régulation des sidérophores yersiniabactin (23). Cette appellation est réservée aux sidérophores synthétisés chez les souches virulentes du genre *Yersinia*. Un îlot de pathogénicité similaire existerait chez des souches virulentes de *E. coli*, de *Citrobacter* et de *Klebsiella* (7). Outre les gènes des yersiniabactin, d'autres transporteurs de fer peuvent être retrouvés dans des îlots de pathogénicité. L'îlot de pathogénicité 2 de *Shigella flexneri* contient des gènes impliqués dans l'acquisition du fer par les aéro bactéines (123,

175). Chez *Salmonella*, tel que mentionné précédemment, le SPI1 comprend l'opéron *sitABCD* codant pour un possible transporteur de fer et de manganèse et un îlot porte le système *sfbABC* (96, 130, 179).

4. Les transporteurs de fer et de manganèse chez *Salmonella*

La dépendance des bactéries face au fer force ces dernières à posséder des systèmes d'acquisition permettant l'approvisionnement dans tous les environnements. Ceci est d'autant plus vrai pour une bactérie comme *Salmonella* qui passe dans son cycle d'infection par des environnements aussi divers que l'intestin, les cellules épithéliales, les plaques de Peyer, le sang et les phagocytes professionnels. Les systèmes d'acquisition du fer chez *Salmonella* incluent les systèmes basés sur les sidérophores pour l'acquisition du Fe^{3+} et des systèmes pour l'acquisition du Fe^{2+} , dont certains, découverts récemment, commencent tout juste à être caractérisés.

4.1. Acquisition du fer ferrique

4.1.1. Les sidérophores

Par la synthèse de sidérophores, de récepteurs pour ces sidérophores et d'un système permettant leur passage dans le cytoplasme, les bactéries se donnent les moyens de capter et d'assimiler le fer ferrique. Les sidérophores sont des molécules de petites tailles, entre 0,5 et 1 kDa, présentant une haute affinité pour le fer ferrique Fe^{3+} (128). On les divise en deux grandes classes quant à leur structure : les hydroxamates et les catecholates. Les sidérophores représentent en quelque sorte la réponse bactérienne au problème de solubilité et de disponibilité du fer dans l'environnement. En effet, tel que mentionné précédemment, le fer dans le milieu ne se retrouve que très peu dans sa forme soluble Fe^{2+} . La grande affinité des sidérophores pour le Fe^{3+} permet à la bactérie de faire compétition avec les molécules qui lient le Fe^{3+} . L'affinité pour le Fe^{2+} est minimale, permettant dans la cellule le relargage du fer suite à sa réduction. L'utilisation de sidérophores implique aussi la possession d'un système pour ramener à la cellule les sidérophores relargués dans l'environnement puisque, trop grosses, elles ne peuvent simplement diffuser à travers les pores.

Il arrive que des bactéries synthétisent plus de récepteurs de sidérophores que de sidérophores. Ceci permet de récupérer les sidérophores relargués par d'autres microorganismes, bactériens ou fongiques. *E. coli* synthétisent six systèmes de transport de Fe^{3+} , mais un seul sidérophore, l'entérobactine (21). Les gènes responsables de la synthèse de l'entérobactine sont les gènes *ent*. Certaines souches de *E. coli* porteraient sur un plasmide pColV les gènes nécessaires à la synthèse de l'aérobactine (type hydroxamate) (175). De la même façon, *S. typhimurium* ne synthétise que l'entérobactine et, certaines souches virulentes, l'aérobactine, mais est capable d'utiliser d'autres sidérophores comme la ferrioxamine et le ferrichrome (113).

FepA est le récepteur de l'entérobactine, un sidérophore du groupe des catécholates, chez *E. coli* et *Salmonella* (21). En plus de FepA, *Salmonella* exprime un deuxième récepteur pour l'entérobactine, IroN, probablement acquis par transfert horizontal (11). Outre l'entérobactine, d'autres sidérophores peuvent être transportés par les même récepteurs. Les sidérophores corynebactine et myxochéline C sont respectivement transférés par IroN et FepA (140).

Les sidérophores ferrioxamines de la classe des hydroxamates ne sont que faiblement transportés par *E. coli*. En revanche, ils représentent une source de fer non-négligeable chez *S. typhimurium*. Le récepteur des ferrioxamines B, E et G chez *Salmonella* serait la protéine membranaire FoxA et FhuCDB, un complexe de type ABC dépendant de l'ATP, serait impliqué dans la traversée de la membrane interne (103). Le gène *foxA* est homologue au gène du même nom chez *Y. enterocolitica* qui code pour le récepteur de la ferrioxamine. *Salmonella* possède aussi le gène *fhuE* dont le produit assure chez *E. coli* le faible transport de la ferrioxamine (163). L'acquisition d'un autre sidérophore de la classe des hydroxamates, le ferrichrome, dépend du complexe FhuBCD et FhuA est son récepteur.

La présence à la membrane de récepteurs permettant la translocation de molécules dépassant la capacité des pores ne procure pas que des avantages à la bactérie. Les récepteurs impliqués dans le rapatriement des sidérophores servent aussi à l'entrée des phages, des toxines et des antibiotiques. FepA, le récepteur de l'entérobactine, sert de porte d'entrée aux colicines B et D (128). FhuA sert aux phages T1, T5, phi80, à la colicine M, à la rifamycine et à l'albomycine (102).

4.1.2. L'importance de la protéine TonB

La translocation des sidérophores à travers la membrane externe ne pouvant se faire par les pores, il existe, comme on vient de le voir, plusieurs récepteurs et protéines associées plus ou moins spécifiques nécessaires à la translocation. Cependant un complexe de trois protéines de la membrane cytoplasmique s'avère indispensable pour fournir l'énergie au passage de presque tous les sidérophores : le complexe TonB-ExbB-ExbD (121). Après la liaison du sidérophore, un changement serait d'abord induit dans le récepteur, FepA par exemple. La nouvelle conformation du récepteur induirait la liaison avec TonB et le gradient électrochimique du proton fournirait l'énergie nécessaire à son changement de conformation. L'affinité du récepteur pour son ligand s'en trouverait alors diminuée et le complexe fer-sidérophore serait libéré dans l'espace périplasmique. La protéine TonB serait recyclée avec le complexe ExbB-ExbD.

En plus de FepA, dont l'étude a permis d'élucider le fonctionnement de TonB, il existe de nombreux autres récepteurs dépendant de TonB pour le transfert de leur ligand dans l'espace périplasmique. Par exemple, FhuA, le récepteur du ferrichrome, interagit avec TonB (102). Le transport de la ferrioxamine G suite à la liaison au récepteur FoxA est

dépendante du complexe FhuCDB et de TonB, mais la dépendance à TonB, n'a pas été montrée pour les ferrioxamines B et E (103).

4.1.3. Les protéines riches en fer

En plus des sidérophores, les bactéries ont développé d'autres moyens d'acquérir le fer ferrique. L'acquisition directe du fer contenu dans les protéines avec groupements hème est commune à plusieurs pathogènes dont *Salmonella* (178). La plupart des systèmes connus impliquent une protéine membranaire qui serait le récepteur et un complexe permettant le transport dans le cytoplasme (21). Le fer lié à la transferrine et à la lactoferrine, bien qu'il puisse être acquis par les sidérophores, pourrait aussi être obtenu directement chez certaines espèces. Dans un modèle d'acquisition élaboré notamment avec des bactéries des genres *Neisseria* et *Haemophilus*, une protéine membranaire permettrait l'attachement du complexe et le fer relâché serait transporté par une perméase de la membrane cytoplasmique (32). La protéine TonB serait impliquée à la fois dans l'acquisition du fer lié aux protéines à hème, à la transferrine et à la lactoferrine (32, 108).

4.1.4. Implication dans les premières étapes de l'infection

En raison de son rôle central la protéine TonB représente une cible de choix pour l'élimination de la fonction d'acquisition du fer ferrique. Privée de la protéine TonB, *S. typhimurium* ne peut plus rapatrier la majeure partie des sidérophores de même que les protéines riches en fer, et aussi tous les nutriments qui sont dépendants de porines spécifiques pour leur acquisition par la bactérie (ex. maltodextrine).

L'équipe de I. Stojiljkovic s'est intéressée à l'effet des délétions des systèmes d'acquisition du fer chez *S. typhimurium* *in vitro* et *in vivo*. En milieu riche, la croissance d'un mutant *tonB* n'est pas affectée, mais en condition limitante en fer, c'est-à-dire avec l'ajout d'un chélateur le 2,2-dipyridyl (DP) à 200 μ M, la croissance est sérieusement compromise (162). La croissance du mutant *tonB* est aussi affectée dans le sérum de souris. Dans les deux cas, il semble que le rôle de l'entérobactine soit prépondérant puisqu'une mutation *entB* dans un gène responsable de la synthèse de l'entérobactine permet d'obtenir le même phénotype qu'avec la mutation *tonB*. Dans les cellules épithéliales Hep-2 et dans les macrophages de la lignée J774, le mutant *tonB* se multiplie au même rythme qu'une souche d'origine ce qui suggère que *Salmonella* utilise des systèmes d'acquisition du fer indépendant de TonB.

Dans un essai de compétition *in vivo* sur quatre jours pour la colonisation de l'intestin, la présence du mutant *tonB* est inférieure à celle de la souche d'origine seulement au jour 2 de l'infection suggérant un rôle lors des premières étapes de l'infection. Les infections subséquentes intragastriques et intrapéritonéales ont supporté cette hypothèse puisque le mutant *tonB* ne s'est avéré atténué que lorsque administré par la voie intragastrique. *In vivo*, il semble que le rôle de l'entérobactine ne soit pas aussi dominant qu'*in vitro* puisqu'un mutant *entB* n'est pas affecté indépendamment du mode d'administration tel que montré précédemment (15, 162). Enfin, en analysant la présence bactérienne dans différents organes après l'infection, il a été montré que le mutant *tonB* était présent en faible nombre par rapport à la souche d'origine dans les plaques de Peyer et dans les ganglions mésentériques, mais aucune différence n'a été observée dans le foie et la rate. L'acquisition du Fe^{3+} de manière TonB-dépendante semble donc prépondérante dans les premières étapes de l'infection par *S. typhimurium*, soit la colonisation de l'intestin et le début de l'invasion du réseau lymphatique, mais pas dans l'étape subséquente de répllication dans les macrophages du foie et de la rate (162).

Une autre équipe s'est intéressée à la délétion des gènes *tonB* et *entB* chez *S. typhi*. Contrairement à ce qui est observé avec *S. typhimurium*, la croissance de mutants *S. typhi tonB* et *entB* est affectée dans la lignée de monocytes humains Mono Mac 6 (67). L'effet des mutations est également observable *in vivo* puisque les deux mutants montrent une virulence plus faible que celle de la souche d'origine (56). Ceci montre que bien que *S. typhi* et *S. typhimurium* soient équipées de systèmes semblables pour acquérir le fer, leur utilisation peut différer dans les étapes de l'infection.

4.2. Acquisition du fer ferreux et du manganèse

Bien que le fer ferrique reste la forme dominante dans plusieurs environnements, la possibilité d'assimiler le fer ferreux procure à la bactérie une plus grande flexibilité. Le transport de fer et de manganèse étant souvent possible par les mêmes systèmes, les transporteurs de ces deux métaux sont présentés ici conjointement.

4.2.1. FeoABC

Le système FeoABC pour le transport du fer ferreux, dont *S. typhimurium* est pourvu, a été décrit originalement chez *E. coli*. (99). Le système est composé d'une petite protéine de 75 acides aminés, codée par *feoA*, et d'une plus grosse de 773 acides aminés codée par *feoB*, un tandem préalablement observé pour le transport d'un autre cation divalent, le

cadmium. FeoB montre deux domaines potentiels de liaison aux nucléotides, suggérant l'utilisation de l'ATP.

L'équipe qui a étudié les phénotypes des mutants *tonB* et *entB* chez *S. typhimurium* s'est en même temps intéressée à la mutation *feoB* (162). La souche *feoB* n'est ni affectée en milieu riche ni dans le sérum de souris. En présence du chélateur DP à 200 μM , la croissance est altérée, mais dans une moindre mesure que *tonB* et *entB*. De plus la combinaison de la mutation *feoB* avec l'une ou l'autre des autres mutations ne permet pas de voir un phénomène additif ; les doubles mutants *feoB tonB* et *feoB entB* montrent le même comportement que les simples mutants *tonB* et *entB*. La multiplication intracellulaire de la souche *feoB* n'est pas affectée dans les cellules Hep-2 et J774 tout comme il a été observé pour *tonB*. *In vivo*, aucune atténuation de la virulence n'a été observée pour la souche *feoB* que l'administration soit intragastrique ou intrapéritonéale. Le seul résultat qui permettrait de suggérer un rôle du système FeoABC lors de la colonisation de l'intestin est obtenu avec l'essai de compétition *in vivo*. Dans cet essai, on montre que la présence du mutant *feoB* est inférieure à celle de la souche d'origine à partir du jour 3 et se maintient le jour 4 de l'infection. Un double mutant *tonB feoB* est toujours inférieur en nombre par rapport à la souche d'origine et ce dès le premier jour.

4.2.2. MntH

Un autre transporteur impliqué dans l'acquisition du manganèse et possiblement du fer ferreux chez *Salmonella* est celui codé par le gène *mntH* qui est homologue aux gènes de la famille *Nramp* décrits précédemment. C'est la haute affinité pour le manganèse qui a amené l'appellation *mntH* pour « H⁺ coupled manganese transport » (100, 138, 138). Les gènes homologues à *Nramp* sont largement distribués chez les bactéries, autant celles vivant préférentiellement en anaérobiose ou en aérobiose, celles qui sont des pathogènes et celles qui n'en sont pas. Un gène procaryote serait la source des gènes eucaryotes, mais le transfert horizontal d'eucaryotes à procaryotes serait à l'origine du gène de certains pathogènes (26).

Les homologues bactériens à *Nramp* ont été caractérisés chez *M. tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* et *S. typhimurium*. L'expression de la protéine de *M. tuberculosis* dans les oocytes de *Xenopus laevis* a permis d'observer une augmentation de 20 fois du transport de Zn^{2+} et de Fe^{2+} et de montrer que ce transport était affecté en excès de Mn^{2+} et de Cu^{2+} (3). Chez *B. subtilis*, une mutation dans le gène *mntH* renverse le phénotype d'hypersensibilité au manganèse d'une souche déficiente pour le régulateur MntR (138).

Chez *E. coli*, un transport de $^{54}\text{Mn}^{2+}$ et de $^{55}\text{Fe}^{2+}$ par MntH de manière dépendante du gradient de proton a été montré de même que la complémentation par surexpression de *mntH* d'un mutant *hflBI* ayant besoin d'un supplément de métaux (114). Le transport de cations divalents a été aussi suggéré chez *Lactobacillus brevis* suite à l'observation que le gène homologue à *Nramp* conférait la résistance à des sous-produits amères issus de la fabrication de la bière. Cette résistance s'expliquerait par la contribution de MntH au maintien du gradient de protons (89). Ainsi, les études de caractérisation des protéines MntH chez les procaryotes tout comme celles menées sur les protéines Nramp chez les eucaryotes dont il a été question plus haut montrent une spécificité de la protéine pour les cations divalents.

Le transport de manganèse par MntH a été montré chez *E. coli* de même que chez *S. typhimurium* et a été associé à la réponse au stress oxydatif (100). Le peroxyde d'hydrogène induit l'expression du gène et les souches *mntH* de *E. coli* et de *S. typhimurium* y montrent une sensibilité accrue. La perte d'une copie fonctionnelle du gène n'affecte pas la survie et la croissance de *S. typhimurium* ni dans les cellules épithéliales Hela ni dans les macrophages RAW264.7 même si le gène y est induit. *In vivo*, l'infection avec une souche *mntH* amène un délai de un à deux jours dans le temps nécessaire pour voir la mortalité de 50% des animaux lorsque l'administration se fait oralement.

4.2.3. SitABCD

D'autres gènes potentiellement impliqués dans l'acquisition du fer ont été récemment identifiés. L'opéron *sitABCD* chez *S. typhimurium* a été isolé pour la première fois lors de l'étude des gènes potentiels du SPI1 par homologie au transporteur *yfeABCD* de *Yersinia pestis* (179). Le transporteur de *Y. pestis* avait été découvert par complémentation d'une souche de *E. coli* déficiente pour la synthèse d'entérobactine (13). Les quatre gènes de l'opéron *yfeA*, *yfeB*, *yfeC* et *yfeD* codent respectivement pour une protéine liant le substrat, une protéine liant l'ATP et deux protéines intégralement membranaires. Ces quatre protéines assemblées forment un transporteur de type ABC. Un cinquième gène, *yfeE*, présent en dehors de l'opéron, coderait pour une protéine possiblement située au niveau de l'enveloppe et impliquée dans le système. Les deux promoteurs contiennent une séquence de liaison pour le facteur de transcription Fur. La transcription de l'opéron *yfeABCD* est augmentée en présence d'une faible quantité de fer et réprimée par l'ajout de manganèse (13). Des travaux subséquents ont montré que le

système YfeABCD peut transporter le fer, le manganèse et le zinc et qu'un mutant *yfeAB* était totalement atténué (12).

Les gènes de l'opéron *sitABCD* chez *S. typhimurium* sont organisés de manière similaire à ceux de l'opéron *yfeABCD* de *Yersinia pestis*. Le gène *sitA* coderait pour la « binding protein » périplasmique, *sitB* pour l'« ATP-binding-protein » et *sitC* et *sitD* pour les deux protéines membranaires formant le complexe de perméases (179). L'opéron *sitABCD* montre une grande similarité avec l'opéron *yfeABCD* de *Y. pestis*, avec le transporteur de manganèse *mnt* identifié chez des représentants du genre *Synechocystis* et avec un transporteur de type ABC identifié chez *Haemophilus influenzae* (10, 13, 31). Tel que mentionné, l'opéron chez *S. typhimurium* est contenu dans le SPI1. Toutefois, le contenu en GC de l'opéron est plus faible que le reste de l'îlot de pathogénicité suggérant que les gènes *sit* n'aient pas été acquis conjointement avec les autres gènes du SPI1. En condition limitante en fer, l'opéron permet, comme chez *Y. pestis*, la complémentation d'une souche de *E. coli* déficiente pour la synthèse des entérobactines. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle en condition limitante de fer a été montrée de même que la nature de la répression par le facteur Fur. Un mutant *sitBCD* ne présente pas de différences avec la souche sauvage quant à sa répllication dans les cellules épithéliales Henle-407 et sa capacité à induire l'apoptose des cellules de la lignée de macrophages J774 (179).

Une technique différente aura permis à une autre équipe de montrer l'importance du système SitABCD chez *S. typhimurium* (96). L'induction de l'opéron a d'abord été montrée avec le système IVET (« *in vivo* expression technology ») qui permet d'identifier des gènes qui sont exprimés durant l'infection. La complémentation de la mutation *purA*, un gène codant pour un facteur nécessaire à toutes les étapes de l'infection, est à la base du système. Un vecteur suicide, c'est-à-dire incapable de se répliquer dans la souche d'intérêt, portant un gène *purA* dépourvu de promoteur est introduit chez *S. typhimurium* et les événements de recombinaison ayant donné lieu à une fusion transcriptionnelle sont sélectionnés par la viabilité des clones dans des hépatocytes en culture. D'abord montrée en culture, l'expression a ensuite été montrée dans la souris par un essai de compétition entre les clones *sit-purA* issus du système IVET et une souche dont la fusion donne une expression constitutive. Les clones *sit-purA* se sont avérés faire compétition dans un rapport 1:1 dans le foie, lorsque l'administration était intrapéritonéale, mais était significativement désavantagée dans l'intestin et dans la rate après administration orale. Cette différence montre l'importance des gènes *sit* dans la phase systémique et la faible ou absence d'induction dans la phase de colonisation de l'intestin. Un mutant *sitABCD*,

généralisé par une insertion dans *sitA* qui bloque l'expression des autres gènes en aval, n'est pas en mesure de faire compétition avec une souche d'origine ni dans le foie et la rate d'animaux injectés intrapéritonéalement ni dans la rate et l'intestin d'animaux infectés oralement. Le défaut associé à *sitABCD* peut être restauré par un plasmide portant l'opéron fonctionnel. *In vitro*, la croissance de la souche *sitABCD* est altérée par rapport à une souche sauvage dans un milieu riche auquel on a ajouté le chélateur DTPA (diéthylène triamine pentaacétate) et dans un milieu minimum contenant le chélateur DP. Le contraire n'étant pas vrai, l'implication de *sitABCD* dans le transport de fer et son rôle possible dans la croissance bactérienne restent à établir.

4.2.4. SfbABC

C'est une autre technique basée sur les fusions transcriptionnelles qui a permis la découverte des gènes *sfbABC* chez *S. enteritidis* (130). Leur expression peut être induite par des chélateurs du fer, le DP et le DTPA, dans un milieu minimum où le fer est limitant et où le pH est acide. Les trois gènes coderaient pour une lipoprotéine périplasmique liant le fer, une « ATP-binding-protein » et une perméase formant ainsi un complexe potentiellement impliqué dans le transport du fer. Le gène *sfbA* a été démontré essentiel à la virulence. Les gènes *sfbABC* avec le gène *ompX* constituent un îlot de pathogénicité présent chez plusieurs sérotypes de *Salmonella* incluant *S. typhimurium*.

4.3. Redondance dans les systèmes d'acquisition

Comme on le voit, il semble exister une certaine redondance dans les systèmes d'acquisition du fer, et dans une moindre mesure du manganèse, chez *Salmonella*, et aussi chez d'autres pathogènes. Le fer ferrique peut être capté par plusieurs systèmes utilisant des sidérophores et par la liaison avec des protéines riches en fer. Quant au fer ferreux, au moins quatre transporteurs potentiels ont été identifiés chez *S. typhimurium*, dont deux transporteraient peut-être aussi le manganèse. Cette redondance dans les systèmes d'acquisition a d'ailleurs été invoquée pour expliquer des phénomènes comme l'absence de défaut du mutant *tonB feoB* pour sa répllication dans les cellules (162).

Cette redondance dans les systèmes d'acquisition peut être vue comme une illustration de l'importance des cations divalents dans la pathogénicité. Cette idée est renforcée par le fait que plusieurs pathogènes comme *Salmonella* et *Yersinia* ont acquis des transporteurs de métaux par transfert horizontal conjointement avec d'autres gènes de virulence. Par exemple, les gènes *sitABCD* et *sfbABC*, démontrés essentiels à la virulence, sont portés

respectivement dans un flot et un îlet de pathogénicité. De plus, au fil de l'évolution et de l'acquisition des gènes de virulence, les métaux ont été appelés à jouer un rôle dans la régulation de ces gènes. Toutes ces observations, couplées à la résistance à l'infection conférée par *Nrampl*, suggèrent un rôle central des cations, comme le fer et le manganèse, dans l'interaction hôte-pathogène de *Salmonella*.

Discussion/Conclusion

1. La construction des mutants

Tel que mentionné dans l'introduction, le projet de maîtrise se divise en deux grands volets, soit la construction des mutants et leur caractérisation. Les expériences de biologie moléculaire ayant permis la réalisation des différentes souches et des outils de complémentation sont d'une importance dont l'article seul ne peut témoigner.

1.1. La souche *mntH*

Le premier mutant sur lequel nous avons travaillé est la souche *mntH*. Dès le départ, le problème de la faible efficacité de transformation des bactéries du genre *Salmonella* s'est posé. Au départ, le plasmide construit pour l'inactivation du gène *mntH* ne comprenait pas d'origine pour la conjugaison bactérienne. Après transformation de *Salmonella* avec ce plasmide, nous n'avons jamais réussi à sélectionner des recombinants, le taux de recombinaison combiné à la faible efficacité de transformation donnant une fréquence trop faible. L'ajout par clonage de l'origine RP4 au plasmide et la transformation du plasmide dans une souche de *E. coli* compétente pour la conjugaison a permis d'utiliser le phénomène naturel de la conjugaison bactérienne et d'augmenter ainsi la quantité de matériel génétique pénétrant dans la souche receveuse. Les bactéries *Salmonella* où un événement de recombinaison simple a entraîné l'intégration du plasmide ont été isolées après une double sélection pour les distinguer à la fois des salmonelles n'ayant pas intégré le plasmide et de la souche donneuse *E. coli* S17 λ pir. La première sélection s'est faite par la résistance au chloramphenicol conférée suite à l'intégration du plasmide, la deuxième par le caractère propre à *Salmonella* de former des colonies foncées à l'aspect métallique sur la gélose au sulfite de bismuth.

1.2. La souche *feoB*

La construction de la souche *S. typhimurium* 14028 *feoB* par le laboratoire d'Igor Stojiljkovic de même que notre construction de la souche keller *feoB* s'est également faite en tirant profit de la conjugaison bactérienne. Le plasmide pEP185.2*feo::tet* tout comme

pTnmntH comporte une origine pour la conjugaison (162). Malgré plusieurs répétitions de la procédure et plusieurs tentatives d'optimisation, un seul clone a pu être obtenu. De plus, pour des raisons inconnues, aucun lysat de phage pouvant être utilisé n'a pu être obtenu de la souche *feoB*. Cette particularité a aussi été observée dans le laboratoire d'I. Stojiljkovic. avec la souche *S. typhimurium* 14028 *feoB*.

1.3. La souche *sitABCD*

La technique choisie pour la construction de la souche *sitABCD* a permis de contourner le problème de faible efficacité de transformation de *Salmonella* sans avoir recours à la conjugaison bactérienne. Le vecteur pKO3 qui a servi à la construction du vecteur pKOsitABCD contient une origine de réplication thermosensible ce qui permet la sélection des transformants et des recombinants en deux étapes (112). La construction du plasmide pKOsitABCD a été laborieuse en raison de l'utilisation d'une cassette de résistance à la streptomycine donnant lieu à des phénomènes de recombinaison indésirés. L'emploi d'une nouvelle cassette amputée dans sa partie 5' envoyée par ceux qui en avaient déposées les séquences a permis ensuite d'obtenir le mutant désiré (39)

1.4. La souche *tonB*

Les souches *mntH*, *feoB* et *sitABCD* ont fait l'objet d'une double vérification par PCR et par analyse de type Southern blot (Fig.5 – annexe 1). La souche *tonB* n'a pas été vérifiée de cette manière. Tout d'abord parce qu'elle a été construite par transduction en utilisant un lysat obtenu d'une souche *tonB* elle même vérifiée par analyse de type Southern blot (162). Ensuite parce qu'une caractérisation du phénotype *tonB* chez *Salmonella* pouvait se faire facilement par la croissance en présence de DP comme l'a fait l'équipe de I. Stojiljkovic.

1.5. La complémentation fonctionnelle du transport de cations par *mntH*

Au fur et à mesure de la génération des résultats, l'intérêt de réaliser des expériences de complémentation fonctionnelle avec le gène *mntH* s'est imposé. En effet, plusieurs expériences suggéraient un rôle pour MntH, mais d'autres transporteurs, plus importants dans les conditions choisies, masquaient en partie la contribution de MntH. C'est le cas

du transport du ^{54}Mn visible seulement dans les souches *sitABCD*, de l'acquisition du ^{55}Fe visible dans les souches *sitABCD feoB*, de la virulence du mutant MF par rapport à F. La surexpression du gène *mntH* allait-elle permettre la complémentation des défauts d'acquisition et/ou de restaurer la virulence ? Si on réussissait à renverser le phénotype en réintroduisant le gène fonctionnel, on pouvait montrer que les défauts observés chez les mutants *mntH* étaient imputables à l'élimination du gène. Pour répondre à ces questions, les plasmides pSKmntH et pSKmntHA ont été construits et utilisés pour transformer les mutants. Ainsi, outre la réalisation des différentes mutations et leur combinaison, les travaux de biologie moléculaire comprennent la construction de plasmides pour la complémentation fonctionnelle par *mntH*. Des travaux ont également été entrepris pour construire un plasmide pour la complémentation par *sitABCD*. En effet, la caractérisation ayant montré l'importance majeure de ce transporteur dans l'acquisition à la fois du fer et du manganèse et son implication dans la virulence, il convenait alors de réaliser les expériences de complémentation aussi avec l'opéron *sitABCD*. Malheureusement, le clonage ne s'est pas fait facilement et après plusieurs tentatives il a dû être abandonné faute de temps. Au moment de reprendre la clonage, il serait approprié d'utiliser un plasmide à faible nombre de copies, au cas où ce serait le trop grand nombre d'exemplaires de l'opéron *sitABCD* qui nuirait à la viabilité des clones.

2. La caractérisation des mutants

2.1. *mntH*, *sitABCD* et *feoB* et l'acquisition du fer et du manganèse

In vitro, plusieurs expériences réalisées dans le laboratoire ont permis de relier chez *E. coli* les mutations étudiées à des problèmes d'acquisition des métaux : transport du ^{54}Mn et ^{55}Fe , croissance dans un milieu minimum sans micronutriments en conditions limitantes de fer, croissance en milieu riche avec le chélateur DP, sensibilité à l'eau oxygénée et hypersensibilité aux métaux (114) (Bergevin et al. non-publié). Si chez *E. coli* un défaut du simple mutant *mntH* a pu être observé dans certaines circonstances, les premières expériences réalisées avec la souche *mntH* de *S. typhimurium* ont surtout servi à montrer la nécessité de combiner les mutations avant de voir apparaître un phénotype. En effet, chez *E. coli*, une sensibilité à l' H_2O_2 est observée chez la souche K12 *mntH* alors qu'il a fallu attendre la combinaison de la mutation *mntH* à *sitABCD* pour observer

un tel défaut chez *S. typhimurium* (Bergevin et al, non-publié). Le même phénomène s'est produit pour la croissance en milieu riche avec le chélateur DP ; seule la combinaison des mutations *mntH* et *sitABCD* permet une baisse marquée de la croissance.

Le fait qu'aucun des mutants ne montre une croissance altérée en milieu riche suggère qu'une quantité abondante de fer disponible compense le déficit en transporteurs spécifiques. Même le triple mutant MSF (*mntH sitABCD feoB*) ne montre pas d'atténuation. Par contre, lorsqu'en milieu minimum la quantité de fer ajouté est inférieure à 1 μM , l'absence des trois transporteurs étudiés résulte en un défaut de croissance (Figure 1A). Ceci suggère que le triple mutant MSF n'est plus capable d'acquérir le fer avec une efficacité suffisante pour maintenir une croissance normale.

Des observations intéressantes ont été faites en milieu minimum lorsque l'on ajoute différentes quantités de manganèse à un milieu contenant 10 nM de fer. On voit chez la souche d'origine W que l'ajout de manganèse permet de pallier dans une certaine mesure au défaut de croissance causé par la faible quantité de fer. Cette compensation n'est pas aussi efficace chez les souches MS et MSF suggérant dès lors un défaut d'acquisition du manganèse pour ces deux souches (Figure 1B). Une autre observation consiste en la grande différence de croissance qui se maintient entre SF et MSF, suggérant un rôle important de MntH en absence des transporteurs SitABCD et FeoABC.

De ces observations, on tire aussi l'information que la croissance dans le milieu minimum utilisé, c'est-à-dire sans ajout de micronutriments et avec 10 nM de fer, définit une condition où nos gènes d'intérêts sont activés. Ceci nous a amené à utiliser cette même condition dans les expériences de transport des radio-isotopes. Les bactéries sont incubées 3 heures dans le milieu minimum, incluant 45 minutes avec le chélateur DP, avant d'être transférées dans le milieu pour l'acquisition.

Les résultats de l'essai de transport du ^{54}Mn démontrent un rôle majeur du système SitABCD dans l'acquisition du manganèse qui n'avait jamais été montré de façon aussi claire par les autres équipes (Figure 1C) (96, 179). On voit un transport de manganèse comparable à la souche d'origine W chez tous les mutants ayant une copie fonctionnelle

des gènes *sit*, même le double mutant MF, mais altérée chez tous les mutants *sitABCD*. Les résultats de cet essai illustrent aussi, dans une moindre mesure mais de façon significative, le transport de manganèse par MntH. Un défaut d'acquisition dû à la mutation *mntH* est observable, mais seulement dans les souches *sitABCD* comme on le voit en comparant les souches MS et S de même que MSF et SF. Le transport de manganèse par MntH est également bien illustré dans les expériences de complémentation où, chez MS et SF, on voit une augmentation du transport du manganèse en présence de pSK*mntH* jusqu'au niveau de la souche W (Fig. 4A). Les souches MS et MSF montrent un niveau de transport presque nul du manganèse. Ceci est consistant avec l'observation faite en milieu minimum de ces deux souches qui ne peuvent utiliser le manganèse pour pallier à la croissance dans la même mesure que les autres souches.

L'importance prépondérante de SitABCD est aussi montrée dans l'essai de transport du ^{55}Fe (Figure 1D). Le seul simple mutant à montrer une légère baisse du transport est le mutant S et le seul double mutant à montrer un transport comparable à celui de la souche d'origine est le double mutant MF. L'effet de la mutation *feoB* est visible par addition à la mutation *sitABCD* dans la souche SF. Un léger effet additif de la mutation *mntH* est observable en comparant les souches MS et S, mais pas avec la comparaison MSF et SF. La contribution possible de MntH au transport du fer est montrée dans la complémentation de la souche SF par surexpression de *mntH* (Figure 4B).

Les résultats que nous avons obtenus pour la caractérisation *in vitro* sont consistants avec ceux des autres équipes ayant travaillé sur les mêmes mutations. Aucun défaut du mutant *feoB* n'avait été détecté *in vitro* sans la combinaison avec une autre mutation (162). Un doute subsistait quant à un défaut de croissance d'une souche *sitABCD*. En effet, la souche a été montrée significativement affectée par le DP dans un milieu minimum, mais pas dans un milieu riche alors que le contraire est observé avec le chélateur DTPA (96). Nous avons montré que la croissance de la souche S est significativement affectée en présence de DP en milieu riche.

2.2. Implication dans la virulence

Différents modes d'administration de la souche déficiente chez la souris permettent d'étudier différentes étapes où un gène peut affecter la virulence. Par exemple, une atténuation présente lors d'une injection orale, mais absente lors d'une injection intrapéritonéale permet de montrer un rôle dans la traversée de la barrière intestinale. Cette stratégie a permis d'associer notamment les gènes du SPI1 à l'étape gastro-intestinale et ceux du SPI2 à l'étape de survie intracellulaire dans les macrophages (30, 57, 91). Les modes d'administration oral, intragastrique et intrapéritonéal ont été utilisés pour caractériser certaines des mutations dans les transporteurs de fer chez *S. typhimurium*, mais aucune administration intraveineuse n'avait été réalisée (96, 162). Lors d'une infection intraveineuse, les bactéries sont immédiatement en contact avec les phagocytes et on peut, s'il y a lieu, suggérer un défaut associé à la survie intracellulaire dans ces phagocytes.

L'équipe de Igor Stojiljkovic avait déjà démontré l'importance des mécanismes dépendants de *tonB* pour l'acquisition du fer pendant la colonisation de l'intestin (162). La virulence de la souche *tonB* était gravement affectée avec une administration intragastrique, mais pas affectée avec une administration intrapéritonéale. La même équipe avait montré l'absence de défaut de réplication du mutant *tonB* dans la lignée RAW264.7. La virulence complète du mutant *tonB* lors d'une administration intraveineuse correspond donc à ce qui était attendu (Fig.2A). D'abord parce que l'administration intraveineuse est plus près de l'administration intrapéritonéale que de l'administration intragastrique puisque dans le cycle d'infection, le pathogène passe successivement par les sites de l'intestin, des plaques de Peyers de la circulation lymphatique et sanguine. Ensuite parce que l'infection intraveineuse permet d'étudier le plus directement possible l'étape d'interaction *in vivo* avec les macrophages du foie et de la rate. Aucun des résultats obtenus n'indique que le gène *tonB*, pourtant unique chez *S. typhimurium*, ne soit essentiel à la survie intracellulaire. Ceci pourrait représenter une particularité de *S. typhimurium* puisque *tonB* joue un rôle important pour la croissance intracellulaire de *Shigella dysenteriae* et de *S. typhi* (67, 146).

Quant au mutant *feoB*, la même équipe n'avait pas observé d'atténuation de la virulence ni avec une administration intragastrique ni avec une administration intrapéritonéale (162). Un défaut de compétition avec la souche d'origine pour la colonisation de l'intestin avait toutefois été noté à partir du jour 3. L'atténuation importante de la virulence que nous montrons pour *feoB* suggère maintenant un rôle dans la survie et/ou la réplication dans les phagocytes (Fig.2A). Toutefois, l'absence complète de phénotypes *in vitro* qui pourraient permettre de différencier F de W et les différences minimales entre MF et M ainsi qu'entre SF et S suggèrent que l'atténuation de la virulence de la souche F ne puisse être attribuée à la seule perte d'une fonction d'acquisition du fer. La protéine FeoB est vraisemblablement requise à une étape précise du cycle d'infection.

Les essais de compétition réalisés par Janakiraman et Slauch avec la fusion transcriptionnelle *sitA-purA* issue du système IVET avaient permis de montrer l'expression des gènes *sitABCD* dans la phase systémique et le peu ou pas d'expression dans les étapes de colonisation de l'intestin (96). De plus, un essai de compétition entre une souche *sitABCD* et une souche d'origine ont montré le désavantage de la souche *sitABCD* que l'administration se fasse oralement ou intrapéritonéalement (96). L'atténuation forte de la souche S avec une administration intraveineuse couplée au défaut de réplication dans la lignée RAW264.7 est consistante avec un rôle majeur dans la phase systémique de réplication dans les macrophages (Fig.2A et 3C).

Nous n'avons pas observé d'atténuation de la virulence due à la seule mutation *mntH* (Fig.2A). L'infection de 10 souris a été réalisée trois fois de manière indépendante pour écarter la possibilité d'une très faible différence observée lors d'une des expériences. Le seul effet de *mntH* observable *in vivo* après une injection intraveineuse consiste en l'effet additif observé avec la mutation *feoB*. L'équipe de Kehres a dit observer un délai de 1 à 2 jours dans le temps nécessaire pour voir la mort de 50% des animaux après injection orale (100). Le phénotype observé est trop faible pour conclure à une implication de MntH principalement au niveau intestinal. La même équipe a montré l'expression du gène dans la lignée de macrophages RAW264.7 (100). L'absence d'atténuation de la virulence chez la souche M n'est pas surprenante dans la mesure où beaucoup de nos expériences *in vitro* – croissance en milieu riche avec DP, acquisition du manganèse, réplication dans les

cellules RAW 264.7 - montrent que le système SitABCD complémente totalement la perte de *mntH* alors que le contraire n'est pas vrai.

Toutes les combinaisons de mutation à l'exception de *mntH sitABCD* amènent une atténuation telle de la virulence qu'aucune mort des animaux n'est observable sur une période de trente jours (Fig.2B). On voit donc un effet additif des mutations *mntH feoB* et *sitABCD feoB*. En revanche, la combinaison *mntH sitABCD* ne contribue pas à diminuer la virulence et on peut se demander si au contraire il n'y a pas plutôt une légère augmentation de la virulence du double mutant par rapport au mutant simple *sitABCD*. Paradoxalement, c'est la combinaison *mntH sitABCD* qui permet d'observer les défauts les défauts les plus remarquables *in vitro*.

2.3. Implication dans la survie intracellulaire dans les macrophages

Tel que mentionné dans l'introduction, il restait à mettre au point dans le laboratoire l'essai à la gentamicine pour l'étude de la survie et de la réplication dans les macrophages. Quatre conditions ont été retenues : cellules RAW 264.7 sauvages sans chélateur, avec BPS, avec DP et RAW 264.7 *Nramp1*⁺. Dans les macrophages de la lignée RAW264.7 qui sont normalement *Nramp1*^{-/-}, aucun mutant étudié ne montre de défaut quant à sa réplication (Fig. 3A). En revanche, dans une lignée de transfectants stables *Nramp1*⁺, aucune souche, pas même W, ne montre de réplication intracellulaire (Fig 3B). La présence de la protéine Nramp1 dans un tel système nous permet de juger l'effet sur les différents mutants de l'appauvrissement du phagosome en cations divalents. En effet, tel que mentionné précédemment, Nramp1 est un transporteur de cations divalents à l'interface du phagosome qui transportent les métaux hors du phagosome. Toutefois, l'expression de la protéine Nramp1 est ici tellement lourde de conséquence que toutes les souches sont grandement affectées. On voit tout de même un défaut de réplication significatif chez MS. C'est alors qu'est né l'intérêt d'un système qui montrerait des caractéristiques intermédiaires quant à la disponibilité des cations divalents dans le phagosome. Deux possibilités étaient envisageables : diminuer la disponibilité des ions dans les RAW *Nramp1*^{-/-} par l'ajout d'un chélateur capable de traverser la membrane plasmique du macrophage ou augmenter leur disponibilité dans les RAW *Nramp1*⁺ en altérant la fonction de Nramp1. Pour cela nous aurions incubé les

cellules en présence de concanamycine, un antibiotique qui, en inhibant les pompes H⁺-ATPases, détruit le gradient de pH entre le phagosome et le cytosol qui est essentiel à la fonction de MntH (94).

Nous avons retenu l'ajout des chélateurs DP et BPS dans les cellules RAW *Nramp1*^{-/-}. La BPS est un chélateur qui contrairement au DP n'est pas capable de complexer le fer intracellulaire (147). Les deux chélateurs entraînent une baisse du nombre de cations divalents disponibles dans l'environnement qui est ressenti par les cellules, mais l'effet du DP est également ressenti à l'intérieur de la cellule. C'est donc l'ajout de DP qui fournit le modèle intermédiaire recherché pour différencier les mutants quant à leur capacité d'acquisition des métaux dans le phagosome.

L'ajout de BPS diminue faiblement la répllication intracellulaire des souches W, MS et MF, mais aucun mutant ne présente de défaut significatif par rapport à W (Fig.6 – annexe 2). En présence de DP, comme en présence de *Nramp1*, la souche la plus affectée parmi les doubles mutants est MS (Fig.3C). Le seul simple mutant à être affecté est la souche S. Les souches MSF et SF sont aussi significativement affectées par le DP, mais dans une moindre mesure que MS et S.

Les résultats obtenus avec les infections *in vivo* semblent montrer l'importance essentielle de l'acquisition du fer. Les souches SF et MSF qui montrent les plus bas niveaux de transport du fer sont complètement atténuées (Fig 1B et 2B). Parmi les simples mutants, la souche S dont on voit le peu de transport de fer est la plus atténuée et toutes les souches ayant perdu le transporteur spécifique de fer FeoABC sont affectées dans leur virulence (Fig 2A et 2B). Cependant, le mutant MF est atténué bien qu'il démontre des capacités d'acquisition du fer égales ou supérieures à la souche d'origine. Il serait intéressant de déterminer si cette capacité est constitutive chez le mutant MF et dans quelle mesure, car il pourrait en résulter des conséquences néfastes sur la virulence. À l'acquisition du fer qui semble essentielle au pouvoir pathogène, s'ajoute celle du manganèse, dont le besoin pour la survie dans le phagosome apparaît en présence de *Nramp1* ou du DP. L'implication du manganèse dans la survie intracellulaire est donc montrée par la faible répllication de S par rapport à F dans les RAW + DP, par le défaut de répllication de MS dans les RAW + DP et RAW *Nramp1*⁺ et par l'augmentation de la

survie par surexpression de *mntH* en présence de DP ou dans les cellules *Nramp1*⁺ (Fig. 3C, 3B et 4E).

2.4. Le manganèse et la sensibilité au stress oxydatif

Une implication importante de la perte des transporteurs de manganèse SitABCD et *MntH* est la sensibilité accrue au stress oxydatif montrée dans l'essai sur disque avec le peroxyde d'hydrogène. Les souches MS et MSF montrent une sensibilité accrue qui peut être corrigée pour MS par la surexpression de *mntH* (Figure 4D). Nous avons également observé que l'ajout de manganèse permet de diminuer la sensibilité à l'H₂O₂ chez MS. La sensibilité de MS et MSF au peroxyde d'hydrogène peut être reliée à un défaut d'acquisition du manganèse. Tel que mentionné dans la revue de littérature, le manganèse est impliqué dans la défense antioxydante, notamment par le biais de la superoxyde dismutases SodA. Un mutant *sodA* présente un défaut de réplication dans les macrophages de la lignée J774 (161).

Est-ce que le défaut de croissance en milieu minimum limité en fer et supplémenté en manganèse observé pour les mutants MS et MSF pourrait s'expliquer par une plus grande sensibilité au stress oxydatif ? Possible, car lors d'une carence en fer, SodB est moins exprimée et SodA induite, et le manganèse joue un rôle primordial dans la résistance au stress oxydatif. Un supplément de manganèse submicromolaire permet de limiter le stress oxydatif des souches exprimant des transporteurs de haute affinité pour ce métal. Le fait que les deux mutants MS et MSF ont une meilleure croissance en présence de 10 µM de manganèse supporte cette interprétation. Cela peut fournir une hypothèse pour essayer d'expliquer le phénotype de sensibilité au DP. De manière significative, ce défaut est limité en présence de 10 µM de manganèse alors qu'il faut 50 µM de fer pour obtenir un effet similaire. Or, le DP a une affinité pour le Fe²⁺ qui est de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle pour le Mn²⁺. Si l'ajout du manganèse fournit un cofacteur efficace pour lutter contre le stress oxydatif présentant peu d'affinité pour le DP, il est logique qu'il soit plus efficace que le fer dans ce test, en vertu de la forte affinité du DP pour le fer.

3. Problématiques et perspectives

Il s'est avéré plusieurs fois qu'un phénotype observé chez MS n'était pas observable chez MSF tel que l'on s'y serait attendu. Le triple mutant ne se conduit pas différemment de la souche W dans les RAW264.7 *Nramp1*⁺ (Fig.3B), il n'est pas aussi atténué que MS dans les cellules en présence du chélateur DP (Fig.3C) et sa croissance en LB avec DP est moins affectée que MS (Fig.4C). De plus, l'utilisation du gène *mntH* sous contrôle de son promoteur et porté par un plasmide a donné des résultats divergents pour la complémentation fonctionnelle des phénotypes observés chez MS et MSF (Fig 4). La complémentation est souvent possible chez MS, mais pas ou dans une moindre mesure chez MSF tel qu'on le voit avec le transport du ⁵⁴Mn (Fig.4A), la sensibilité à l'H₂O₂ (Fig.4D) et la croissance en LB DP (Fig.4C)

Nous avons donc plus d'exemples qu'il n'en faut pour comprendre que les phénotypes observés ne sont pas que la simple addition des effets des mutations individuelles. L'ajout de la mutation *feoB* aux mutations *mntH* et *sitABCD* modifie le système. Dans certains cas, ceci peut faire apparaître ou amplifier des phénotypes comme on le voit avec le défaut de croissance marqué en milieu minimum (Fig.1A), la baisse du transport du ⁵⁵Fe (Fig.1D) ou l'atténuation complète de la virulence (Fig.2B). Dans d'autres cas, l'ajout de la mutation *feoB* dans un contexte *mntH sitABCD* masque ou atténue des phénotypes qui étaient observables chez MS comme le défaut de répllication dans les cellules RAW264.7 (Fig.3B,3C) et le défaut de croissance en LB DP (Fig.4C) ou la complémentation fonctionnelle par *mntH* (Fig.4). En outre, on observe aussi que la pleine complémentation possible chez MS ne l'est plus chez MSF comme avec le transport du ⁵⁴Mn (Fig.4A), la sensibilité à l'H₂O₂ (Fig.4D) et croissance en LB DP (Fig.4C). La mutation *feoB* peut donc avoir un effet sur le système qui dépasse la seule privation d'un transporteur de fer.

Tel que mentionné dans la revue de littérature, la régulation de l'acquisition des métaux peut être complexe et dépendante de mécanismes de régulation de la virulence (exemple PhoP/PhoQ 1.4.4). Pour les mutants qui ont démontré un défaut sévère d'acquisition du Mn²⁺ et/ou du Fe²⁺ *in vitro*, on peut suggérer qu'une carence en métal pourrait constituer un signal d'une étape d'infection et déclencher l'expression de facteurs de virulence. Ceci pourrait fournir une piste pour expliquer le comportement de MS *in vivo* qui conserve une

certaine virulence. Dans un triple mutant comme MSF la régulation des gènes de virulence par les métaux pourrait être altérée, ce qui permettrait d'expliquer en partie des comportements de la souche MSF jugés à première vue surprenants en comparaison avec le comportement de MS. De la même manière, on pourrait évoquer une dérégulation due à la carence en manganèse chez MS, dont la virulence semble inférieure à celle de S. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante puisqu'on a récemment démontré que la résistance conférée à la souris par *Nramp1* vient de l'appauvrissement en manganèse de l'environnement du pathogène.

Les expériences de complémentation montrent que la surexpression du gène *mntH* contrôlé par son promoteur permet de corriger les phénotypes de MS observés *in vitro* (Fig.4), mais pas *in vivo* (Fig.7 – annexe 3). Il est possible que la complémentation observée corresponde aux cas où l'entrée du métal permet de corriger le défaut : transport de fer et de manganèse, résistance au DP, à l'eau oxygénée et aux cellules RAW 264.7 en présence de DP. Cependant, lors des interactions avec les cellules *in vitro* les mutants MS transformés avec soit pSK*mntH*, soit pSK*mntH*Δ sont moins résistants que la souche MS sans plasmide (Fig. 4E). Ceci suggère que le plasmide, qui est présent en plusieurs centaines de copies, influe sur l'état de la bactérie et ce même s'il est tronqué. L'hypothèse la plus plausible serait un phénomène de titration des facteurs de régulation (répresseurs) qui interagissent normalement avec le promoteur de *mntH*, comme il a été récemment observé (131). Ainsi, sans carence particulière en métal, les répresseurs actifs, c'est-à-dire complexés avec leur co-facteur métallique, se trouveraient déplacés vers les multiples copies du promoteur de *mntH*. L'expression de nombreuses fonctions impliquées dans l'acquisition des métaux serait en conséquence déprimée comme lors d'un état de carence, et cela perturberait le métabolisme bactérien. Ce type de défaut pourrait expliquer la plus grande sensibilité des mutants MS transformés face aux cellules RAW 264.7. Ce phénomène serait probablement moins prononcé dans le cas où les métaux sont rares, et par conséquent les répresseurs déjà inactivés, comme lors d'une infection *in vivo*. Cependant l'expérience de complémentation de la virulence des souches *in vivo* n'a pas permis de démontrer un rôle positif de *mntH*. Ceci est à rapprocher également de l'observation que MS est très atténué dans les cellules RAW 264.7, mais

relativement peu *in vivo*. Sans aucun doute, des expériences additionnelles sont requises pour parvenir à une compréhension de ces phénomènes.



D'abord orientés principalement sur le gène *mntH*, les travaux de mon projet de maîtrise auront permis de montrer l'importance des systèmes MntH, SitABCD et FeoABC dans la pathogénicité de *S. typhimurium*. Le transporteur SitABCD est d'une importance prépondérante tant pour le transport du manganèse que le transport du fer. Sachant, que l'opéron *sitABCD* est porté par un îlot de pathogénicité et qu'il avait déjà été montré essentiel à la virulence, les résultats obtenus sont en accord avec les modèles élaborés précédemment. En addition à la mutation *sitABCD*, on voit un effet certain des mutations *mntH* et *feoB* sur l'acquisition respective du manganèse et du fer. La contribution de MntH au transport de fer, minimale dans les conditions étudiées, ne peut toutefois être exclue. Il est connu depuis longtemps que le fer est essentiel à la virulence de *Salmonella*, et d'un grand nombre de pathogènes. À l'acquisition du fer, nous ajoutons maintenant l'acquisition du manganèse, nécessaire pour résister à différents stress comme le peroxyde d'hydrogène, l'appauvrissement du phagosome en cation divalent par Nramp1 ou un chélateur intracellulaire et la croissance dans un milieu minimum limitant en fer. Même si on voit l'importance prépondérante du transporteur SitABCD sur MntH, les résultats obtenus s'inscrivent en conformité avec le modèle de compétition dans le phagosome du macrophage entre MntH et la protéine Nramp1 pour l'acquisition des cations divalents. Une avenue à explorer serait l'étude de gènes *mntH* d'autres groupes dans le modèle de compétition. Plus précisément, nous voudrions vérifier si un gène *mntH* de groupe C, dont on suppose une origine eucaryote, ne serait pas plus efficace pour rivaliser avec Nramp1 que le gène de groupe A de *S. typhimurium* (26).



Remerciements

Le présent mémoire est l'aboutissement de plus de deux années d'investissement non seulement de ma part, mais de la part de toute une équipe. En premier lieu, je désire remercier mon directeur de recherche pour la proposition du projet et son apport au fur et à mesure de son avancement. Je désire également remercier les Dr Danielle Malo et Philippe Gros pour les suggestions et commentaires, et aussi pour m'avoir permis de réaliser des expériences avec les animaux en fournissant respectivement l'expertise et les souris « knock-out » 129sv *Nramp1*^{-/-}. Je remercie pour sa contribution exceptionnelle M. Jacques Beaubien qui a réalisé les expériences avec les radioisotopes et a travaillé à quelques étapes en biologie moléculaire. Merci à Line Laroche du laboratoire de D. Malo pour m'avoir enseigné la manipulation des animaux.

Merci Jacques pour une aide technique dont je n'aurais pu me priver, mais aussi pour ta sagesse. Merci à Étienne, Isabelle, Hortence et Pascal pour l'entraide et l'esprit d'équipe.

Pour le support financier, j'adresse mes remerciements à la Fondation Armand-Frappier qui m'a octroyé des bourses d'études au cours de mes deux années de maîtrise. Je souligne aussi la contribution du CRSNG pour la bourse de stage d'été reçue en 1999.

Je termine en remerciant les gens d'« American Society for Microbiology » qui me permettent de reproduire dans mon mémoire l'article soumis au journal « Infection & Immunity ».

Bibliographie

1. Fact Sheet No 139 - *Salmonella*. World Health Organization (www.who.int) . 1997.
Ref Type: Electronic Citation
2. **Abel, L., F. O. Sanchez, J. Oberti, N. V. Thuc, L. V. Hoa, V. D. Lap, E. Skamene, P. H. Lagrange, and E. Schurr.** 1998. Susceptibility to leprosy is linked to the human NRAMP1 gene. *J. Infect. Dis.* **177**:133-145.
3. **Agranoff, D., I. M. Monahan, J. A. Mangan, P. D. Butcher, and S. Krishna.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the *Nramp* family. *J. Exp. Med.* **190**:717-724.
4. **Ahmer, B. M., J. van Reeuwijk, P. R. Watson, T. S. Wallis, and F. Heffron.** 1999. *Salmonella* SirA is a global regulator of genes mediating enteropathogenesis. *Mol. Microbiol.* **31**:971-982.
5. **Alvarez-Dominguez, C., L. Mayorga, and P. D. Stahl.** 1999. Sequential maturation of phagosome provides unique targets for pathogens, pp. 285-297. *In Phagocytosis : The Host* Jai Press Inc, Stamford, CO.
6. **Alvarez-Dominguez, C., R. Roberts, and P. D. Stahl.** 1997. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 6)**:731-743.
7. **Bach, S., A. de Almeida, and E. Carniel.** 2000. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**:289-294.

8. **Bajaj, V., C. Hwang, and C. A. Lee.** 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* **18**:715-727.
9. **Bajaj, V., R. L. Lucas, C. Hwang, and C. A. Lee.** 1996. Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol. Microbiol.* **22**:703-714.
10. **Bartsevich, V. V. and H. B. Pakrasi.** 1995. Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese: analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *EMBO J.* **14**:1845-1853.
11. **Baumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch, and F. Heffron.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **180**:1446-1453.
12. **Bearden, S. W. and R. D. Perry.** 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol. Microbiol.* **32**:403-414.
13. **Bearden, S. W., T. M. Staggs, and R. D. Perry.** 1998. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J. Bacteriol.* **180**:1135-1147.
14. **Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, H. C. Whittle, and A. V. Hill.** 1998. Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N. Engl. J. Med.* **338**:640-644.

15. **Benjamin, W. H., Jr., C. L. Turnbough, Jr., B. S. Posey, and D. E. Briles.** 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infect. Immun.* **50**:392-397.
16. **Blanc-Potard, A. B. and E. A. Groisman.** 1997. The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16**:5376-5385.
17. **Blanc-Potard, A. B., F. Solomon, J. Kayser, and E. A. Groisman.** 1999. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **181**:998-1004.
18. **Bradley, D. J.** 1977. Regulation of *Leishmania* populations within the host. II. genetic control of acute susceptibility of mice to *Leishmania donovani* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **30**:130-140.
19. **Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan.** 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2465-2467.
20. **Brumell, J. H., C. M. Rosenberger, G. T. Gotto, S. L. Marcus, and B. B. Finlay.** 2001. SifA permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol.* **3**:75-84.
21. **Byers, B. R. and J. E. L. Arceneaux.** 1998. Microbial Iron Transport: Iron Acquisition by Pathogenic Microorganisms, pp. 37-66. *In* A. Sigel and H. Sigel (ed.), *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals* Marcel Dekker Inc, New York.

22. **Canonne-Hergaux, F., S. Gruenheid, P. Ponka, and P. Gros.** 1999. Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* **93**:4406-4417.
23. **Carniel, E.** 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes. Infect.* **3**:561-569.
24. **Cellier, M.** 2001. Bacterial genes controlling manganese accumulation, pp. 325-345. *In* Microbial Transport Systems G. Winkelmann Ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
25. **Cellier, M., G. Prive, A. Belouchi, T. Kwan, V. Rodrigues, W. Chia, and P. Gros.** 1995. *Nramp* defines a family of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:10089-10093.
26. **Cellier, M. F., I. Bergevin, E. Boyer, and E. Richer.** 2001. Polyphyletic origins of bacterial *Nramp* transporters. *Trends Genet.* **17**:365-370.
27. **Chamnongpol, S. and E. A. Groisman.** 2000. Acetyl phosphate-dependent activation of a mutant PhoP response regulator that functions independently of its cognate sensor kinase. *J. Mol. Biol.* **300**:291-305.
28. **Chen, C. Y., L. Eckmann, S. J. Libby, F. C. Fang, S. Okamoto, M. F. Kagnoff, J. Fierer, and D. G. Guiney.** 1996. Expression of *Salmonella typhimurium rpoS* and *rpoS*-dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **64**:4739-4743.

-
29. **Chen, X. Z., J. B. Peng, A. Cohen, H. Nelson, N. Nelson, and M. A. Hediger.** 1999. Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* **274**:35089-35094.
 30. **Cirillo, D. M., R. H. Valdivia, D. M. Monack, and S. Falkow.** 1998. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.* **30**:175-188.
 31. **Claverys, J. P.** 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* **152**:231-243.
 32. **Cornelissen, C. N. and P. F. Sparling.** 1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**:843-850.
 33. **Cotter, P. A. and V. J. DiRita.** 2000. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:519-565.
 34. **Crosa, J. H., D. J. Brenner, W. H. Ewing, and S. Falkow.** 1973. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. *J. Bacteriol.* **115**:307-315.
 35. **Cuellar-Mata, P., N. Jabado, J. Liu, W. Furuya, B. B. Finlay, P. Gros, and S. Grinstein.** 2002. *Nrampl* modifies the fusion of *Salmonella typhimurium*-containing vacuoles with cellular endomembranes in macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**:2258-2265.
 36. **Curie, C., J. M. Alonso, M. Le Jean, J. R. Ecker, and J. F. Briat.** 2000. Involvement of *NRAMP1* from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* **347 Pt 3**:749-755.

37. De Groote, M. A., U. A. Ochsner, M. U. Shiloh, C. Nathan, J. M. McCord, M. C. Dinauer, S. J. Libby, A. Vazquez-Torres, Y. Xu, and F. C. Fang. 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94:13997-14001.
38. Deiwick, J., T. Nikolaus, S. Erdogan, and M. Hensel. 1999. Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. Mol. Microbiol. 31:1759-1773.
39. Dennis, J. J. and G. J. Zylstra. 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. Appl. Environ. Microbiol. 64:2710-2715.
40. Donnenberg, M. S. 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature 406:768-774.
41. Eckmann, L., J. Fierer, and M. F. Kagnoff. 1996. Genetically resistant (*Ity*^r) and susceptible (*Ity*^s) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with *Salmonella dublin*. J. Immunol. 156:2894-2900.
42. Ewing. 1986. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae In, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co.Inc., New York.
43. Fang, F. C., M. A. DeGroote, J. W. Foster, A. J. Baumler, U. Ochsner, T. Testerman, S. Bearson, J. C. Giard, Y. Xu, G. Campbell, and T. Laessig. 1999. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96:7502-7507.

-
44. **Fang, F. C., S. J. Libby, N. A. Buchmeier, P. C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, and D. G. Guiney.** 1992. The alternative sigma factor katF (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:11978-11982.

 45. **Fang, F. C., A. Vazquez-Torres, and Y. Xu.** 1997. The transcriptional regulator SoxS is required for resistance of *Salmonella typhimurium* to paraquat but not for virulence in mice. *Infect. Immun.* **65**:5371-5375.

 46. **Farrant, J. L., A. Sansone, J. R. Canvin, M. J. Pallen, P. R. Langford, T. S. Wallis, G. Dougan, and J. S. Kroll.** 1997. Bacterial copper- and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Mol. Microbiol.* **25**:785-796.

 47. **Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Heffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:5189-5193.

 48. **Figuroa-Bossi, N. and L. Bossi.** 1999. Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Mol. Microbiol.* **33**:167-176.

 49. **Figuroa-Bossi, N., S. Uzzau, D. Maloriol, and L. Bossi.** 2001. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* **39**:260-271.

 50. **Fleming, M. D., M. A. Romano, M. A. Su, L. M. Garrick, M. D. Garrick, and N. C. Andrews.** 1998. *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:1148-1153.

51. **Fleming, M. D., C. C. Trenor, III, M. A. Su, D. Foernzler, D. R. Beier, W. F. Dietrich, and N. C. Andrews.** 1997. Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat. Genet.* **16**:383-386.
52. **Flint, D. H., J. F. Tuminello, and M. H. Emptage.** 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**:22369-22376.
53. **Forbes, J. R. and P. Gros.** 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host- pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **9**:397-403.
54. **Fu, Y. and J. E. Galan.** 1998. The *Salmonella typhimurium* tyrosine phosphatase SptP is translocated into host cells and disrupts the actin cytoskeleton. *Mol. Microbiol.* **27**:359-368.
55. **Fu, Y. and J. E. Galan.** 1999. A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**:293-297.
56. **Furman, M., A. Fica, M. Saxena, J. L. Di Fabio, and F. C. Cabello.** 1994. *Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice. *Infect. Immun.* **62**:4091-4094.
57. **Galan, J. E. and R. Curtiss, III.** 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:6383-6387.
58. **Gallois, A., J. R. Klein, L. A. Allen, B. D. Jones, and W. M. Nauseef.** 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded type III secretion system mediates exclusion of NADPH oxidase assembly from the phagosomal membrane. *J. Immunol.* **166**:5741-5748.

59. **Garcia-del Portillo, F. and B. B. Finlay.** 1995. Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J. Cell Biol.* **129**:81-97.
60. **Garcia-del Portillo, F. and B. B. Finlay.** 1995. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol.* **3**:373-380.
61. **Garcia, V. E., F. C. Soncini, and E. A. Groisman.** 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell* **84**:165-174.
62. **Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *N. Engl. J. Med.* **338**:1333-1338.
63. **Goldberg, M. B., S. A. Boyko, and S. B. Calderwood.** 1991. Positive transcriptional regulation of an iron-regulated virulence gene in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:1125-1129.
64. **Goldberg, M. B., V. J. DiRita, and S. B. Calderwood.** 1990. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using *TnphoA* mutagenesis. *Infect. Immun.* **58**:55-60.
65. **Gomes, M. S. and R. Appelberg.** 1998. Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology* **95**:165-168.
66. **Gonzalez-Flecha, B. and B. Demple.** 1995. Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:13681-13687.

67. **Gorbacheva, V. Y., G. Faundez, H. P. Godfrey, and F. C. Cabello.** 2001. Restricted growth of *ent(-)* and *tonB* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human Mono Mac 6 monocytic cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**:7-11.
68. **Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, C. G. Pfeifer, S. L. Marcus, S. D. Mills, D. J. Hackam, S. Grinstein, D. Malo, B. B. Finlay, and P. Gros.** 1999. Functional expression of *Nramp1* *in vitro* in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect. Immun.* **67**:2225-2232.
69. **Gralnick, J. and D. Downs.** 2001. Protection from superoxide damage associated with an increased level of the YggX protein in *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:8030-8035.
70. **Groisman, E. A.** 2001. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* **183**:1835-1842.
71. **Groisman, E. A., E. Chiao, C. J. Lipps, and F. Heffron.** 1989. *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:7077-7081.
72. **Groisman, E. A., J. Kayser, and F. C. Soncini.** 1997. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments. *J. Bacteriol.* **179**:7040-7045.
73. **Groisman, E. A. and H. Ochman.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**:791-794.
74. **Gros, P., E. Skamene, and A. Forget.** 1981. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J. Immunol.* **127**:2417-2421.

-
75. Gruenheid, S., F. Canonne-Hergaux, S. Gauthier, D. J. Hackam, S. Grinstein, and P. Gros. 1999. The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J. Exp. Med.* **189**:831-841.

 76. Gruenheid, S., E. Pinner, M. Desjardins, and P. Gros. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.* **185**:717-730.

 77. Guiney, D. G. 1997. Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *J. Clin. Invest* **99**:565-569.

 78. Guiney, D. G., F. C. Fang, M. Krause, and S. Libby. 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* **124**:1-9.

 79. Gulig, P. A., T. J. Doyle, M. J. Clare-Salzler, R. L. Maiese, and H. Matsui. 1997. Systemic infection of mice by wild-type but not Spv- *Salmonella typhimurium* is enhanced by neutralization of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* **65**:5191-5197.

 80. Gulig, P. A., T. J. Doyle, J. A. Hughes, and H. Matsui. 1998. Analysis of host cells associated with the Spv-mediated increased intracellular growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect. Immun.* **66**:2471-2485.

 81. Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller. 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**:1171-1182.

-
82. **Gunn, J. S. and S. I. Miller.** 1996. PhoP-PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* **178**:6857-6864.
83. **Gunshin, H., B. Mackenzie, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan, and M. A. Hediger.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**:482-488.
84. **Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science* **276**:250-253.
85. **Guo, L., K. B. Lim, C. M. Poduje, M. Daniel, J. S. Gunn, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**:189-198.
86. **Hackam, D. J., O. D. Rotstein, W. Zhang, S. Gruenheid, P. Gros, and S. Grinstein.** 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (*Nramp1*) impairs phagosomal acidification. *J. Exp. Med.* **188**:351-364.
87. **Hardt, W. D., L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo, and J. E. Galan.** 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**:815-826.
88. **Hashim, S., K. Mukherjee, M. Raje, S. K. Basu, and A. Mukhopadhyay.** 2000. Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **275**:16281-16288.

-
89. **Hayashi, N., M. Ito, S. Horiike, and H. Taguchi.** 2001. Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:596-603.
90. **Hensel, M., J. E. Shea, B. Raupach, D. Monack, S. Falkow, C. Gleeson, T. Kubo, and D. W. Holden.** 1997. Functional analysis of *ssaJ* and the *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.* **24**:155-167.
91. **Hensel, M., J. E. Shea, S. R. Waterman, R. Mundy, T. Nikolaus, G. Banks, A. Vazquez-Torres, C. Gleeson, F. C. Fang, and D. W. Holden.** 1998. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **30**:163-174.
92. **Imlay, J. A.** 1995. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**:19767-19777.
93. **Imlay, J. A. and I. Fridovich.** 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:6957-6965.
94. **Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein, and P. Gros.** 2000. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* **192**:1237-1248.

95. **Jakubovics, N. S., A. W. Smith, and H. F. Jenkinson.** 2000. Expression of the virulence-related Sca (Mn²⁺) permease in *Streptococcus gordonii* is regulated by a diphtheria toxin metallopressor-like protein ScaR. *Mol. Microbiol.* **38**:140-153.
96. **Janakiraman, A. and J. M. Slauch.** 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **35**:1146-1155.
97. **Jones, B. D. and S. Falkow.** 1996. Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:533-561.
98. **Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest* **95**:55-65.
99. **Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:6212-6219.
100. **Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay, and M. E. Maguire.** 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* **36**:1085-1100.
101. **Keyer, K. and J. A. Imlay.** 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:13635-13640.
102. **Killmann, H., M. Braun, C. Herrmann, and V. Braun.** 2001. FhuA barrel-cork hybrids are active transporters and receptors. *J. Bacteriol.* **183**:3476-3487.

-
103. **Kingsley, R. A., R. Reissbrodt, W. Rabsch, J. M. Ketley, R. M. Tsolis, P. Everest, G. Dougan, A. J. Baumler, M. Roberts, and P. H. Williams.** 1999. Ferrioxamine-mediated Iron(III) utilization by *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1610-1618.
104. **Klein, J. R. and B. D. Jones.** 2001. *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect. Immun.* **69**:737-743.
105. **Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan, and S. I. Aizawa.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**:602-605.
106. **Kuhn, D. E., B. D. Baker, W. P. Lafuse, and B. S. Zwillig.** 1999. Differential iron transport into phagosomes isolated from the RAW264.7 macrophage cell lines transfected with *Nramp1*Gly169 or *Nramp1*Asp169. *J. Leukoc. Biol.* **66**:113-119.
107. **Kuhn, D. E., W. P. Lafuse, and B. S. Zwillig.** 2001. Iron transport into *mycobacterium avium*-containing phagosomes from an *Nramp1*(Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. *J. Leukoc. Biol.* **69**:43-49.
108. **Lee, B. C.** 1995. Quelling the red menace: haem capture by bacteria. *Mol. Microbiol.* **18**:383-390.
109. **Lesnick, M. L., N. E. Reiner, J. Fierer, and D. G. Guiney.** 2001. The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **39**:1464-1470.

-
110. **Leung, K. Y. and B. B. Finlay.** 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **88**:11470-11474.
111. **Libby, S. J., M. Lesnick, P. Hasegawa, E. Weidenhammer, and D. G. Guiney.** 2000. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. Cell Microbiol. **2**:49-58.
112. **Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church.** 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. J. Bacteriol. **179**:6228-6237.
113. **Luckey, M., J. R. Pollack, R. Wayne, B. N. Ames, and J. B. Neilands.** 1972. Iron uptake in *Salmonella typhimurium*: utilization of exogenous siderochromes as iron carriers. J. Bacteriol. **111**:731-738.
114. **Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. Mol. Microbiol. **35**:1065-1078.
115. **Malo, D., K. Vogan, S. Vidal, J. Hu, M. Cellier, E. Schurr, A. Fuks, N. Bumstead, K. Morgan, and P. Gros.** 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. Genomics **23**:51-61.
116. **Marcus, S. L., J. H. Brumell, C. G. Pfeifer, and B. B. Finlay.** 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes. Infect. **2**:145-156.

-
117. **Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche, and G. Dougan.** 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**:237-248.
118. **McGhie, E. J., R. D. Hayward, and V. Koronakis.** 2001. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J.* **20**:2131-2139.
119. **Miller, S. I., A. M. Kukral, and J. J. Mekalanos.** 1989. A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:5054-5058.
120. **Mittrucker, H. W. and S. H. Kaufmann.** 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J. Leukoc. Biol.* **67**:457-463.
121. **Moeck, G. S. and J. W. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**:675-681.
122. **Monack, D. M., D. Hersh, N. Ghori, D. Bouley, A. Zychlinsky, and S. Falkow.** 2000. *Salmonella* exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *J. Exp. Med.* **192**:249-258.
123. **Moss, J. E., T. J. Cardozo, A. Zychlinsky, and E. A. Groisman.** 1999. The *selC*-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **33**:74-83.

-
124. **Mouy, R., A. Fischer, E. Vilmer, R. Seger, and C. Griscelli.** 1989. Incidence, severity, and prevention of infections in chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.* **114**:555-560.
125. **Mukherjee, K., S. Parashuraman, M. Raje, and A. Mukhopadhyay.** 2001. SopE Acts as an Rab5-specific Nucleotide Exchange Factor and Recruits Non-prenylated Rab5 on *Salmonella*-containing Phagosomes to Promote Fusion with Early Endosomes. *J. Biol. Chem.* **276**:23607-23615.
126. **Mukherjee, K., S. A. Siddiqi, S. Hashim, M. Raje, S. K. Basu, and A. Mukhopadhyay.** 2000. Live *Salmonella* recruits N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein on phagosomal membrane and promotes fusion with early endosome. *J. Cell Biol.* **148**:741-753.
127. **Nauciel, C. and F. Espinasse-Maes.** 1992. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect. Immun.* **60**:450-454.
128. **Neilands, J. B.** 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem.* **270**:26723-26726.
129. **Orgad, S., H. Nelson, D. Segal, and N. Nelson.** 1998. Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J. Exp. Biol.* **201** (Pt 1):115-120.
130. **Pattery, T., J. P. Hernalsteens, and H. De Greve.** 1999. Identification and molecular characterization of a novel *Salmonella enteritidis* pathogenicity islet encoding an ABC transporter. *Mol. Microbiol.* **33**:791-805.

-
131. **Patzer, S. I. and K. Hantke.** 2001. Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:4806-4813.
132. **Plant, J. and A. A. Glynn.** 1979. Locating *salmonella* resistance gene on mouse chromosome 1. *Clin. Exp. Immunol.* **37**:1-6.
133. **Pollock, J. D., D. A. Williams, M. A. Gifford, L. L. Li, X. Du, J. Fisherman, S. H. Orkin, C. M. Doerschuk, and M. C. Dinauer.** 1995. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* **9**:202-209.
134. **Pomposiello, P. J. and B. Demple.** 2000. Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* **182**:23-29.
135. **Portnoy, M. E., X. F. Liu, and V. C. Culotta.** 2000. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the *nramp* family of metal transporters. *Mol. Cell Biol.* **20**:7893-7902.
136. **Posey, J. E. and F. C. Gherardini.** 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**:1651-1653.
137. **Posey, J. E., J. M. Hardham, S. J. Norris, and F. C. Gherardini.** 1999. Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:10887-10892.
138. **Que, Q. and J. D. Helmann.** 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* **35**:1454-1468.

-
139. **Qureshi, S. T., P. Gros, and D. Malo.** 1999. The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflamm. Res.* **48**:613-620.
140. **Rabsch, W., W. Voigt, R. Reissbrodt, R. M. Tsolis, and A. J. Baumler.** 1999. *Salmonella typhimurium* IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores. *J. Bacteriol.* **181**:3610-3612.
141. **Ramarathinam, L., D. W. Niesel, and G. R. Klimpel.** 1993. *Salmonella typhimurium* induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J. Immunol.* **150**:3973-3981.
142. **Rathman, M., L. P. Barker, and S. Falkow.** 1997. The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is independent of the mechanism of bacterial entry. *Infect. Immun.* **65**:1475-1485.
143. **Rathman, M., M. D. Sjaastad, and S. Falkow.** 1996. Acidification of phagosomes containing *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Infect. Immun.* **64**:2765-2773.
144. **Raupach, B. and S. H. Kaufmann.** 2001. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:417-428.
145. **Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, and J. J. Farmer, III.** 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* **27**:313-320.

-
146. **Reeves, S. A., A. G. Torres, and S. M. Payne.** 2000. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.* **68**:6329-6336.
147. **Romeo, A. M., L. Christen, E. G. Niles, and D. J. Kosman.** 2001. Intracellular chelation of iron by bipyridyl inhibits DNA virus replication: ribonucleotide reductase maturation as a probe of intracellular iron pools. *J. Biol. Chem.* **276**:24301-24308.
148. **Sadosky, A. B., J. W. Wilson, H. M. Steinman, and H. A. Shuman.** 1994. The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J. Bacteriol.* **176**:3790-3799.
149. **Sebastiani, G., G. Leveque, L. Lariviere, L. Laroche, E. Skamene, P. Gros, and D. Malo.** 2000. Cloning and characterization of the murine toll-like receptor 5 (Tlr5) gene: sequence and mRNA expression studies in *Salmonella*-susceptible MOLF/Ei mice. *Genomics* **64**:230-240.
150. **St John, G. and H. M. Steinman.** 1996. Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **178**:1578-1584.
151. **Stein, M. A., K. Y. Leung, M. Zwick, F. Garcia-del Portillo, and B. B. Finlay.** 1996. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **20**:151-164.

-
152. **Storz, G., M. F. Christman, H. Sies, and B. N. Ames.** 1987. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **84**:8917-8921.
153. **Storz, G. and J. A. Imlay.** 1999. Oxidative stress. Curr. Opin. Microbiol. **2**:188-194.
154. **Sturgill-Koszycki, S., U. E. Schaible, and D. G. Russell.** 1996. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. EMBO J. **15**:6960-6968.
155. **Sturgill-Koszycki, S., P. H. Schlesinger, P. Chakraborty, P. L. Haddix, H. L. Collins, A. K. Fok, R. D. Allen, S. L. Gluck, J. Heuser, and D. G. Russell.** 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science **263**:678-681.
156. **Supek, F., L. Supekova, H. Nelson, and N. Nelson.** 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **93**:5105-5110.
157. **Switala, J., B. L. Triggs-Raine, and P. C. Loewen.** 1990. Homology among bacterial catalase genes. Can. J. Microbiol. **36**:728-731.
158. **Taylor, P. D., C. J. Inchley, and M. P. Gallagher.** 1998. The *Salmonella typhimurium* AhpC polypeptide is not essential for virulence in BALB/c mice but is recognized as an antigen during infection. Infect. Immun. **66**:3208-3217.
159. **Thomine, S., R. Wang, J. M. Ward, N. M. Crawford, and J. I. Schroeder.** 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in

-
- Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97:4991-4996.
160. **Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard, and S. Despied.** 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. J. Bacteriol. 177:2305-2314.
161. **Tsolis, R. M., A. J. Baumler, and F. Heffron.** 1995. Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. Infect. Immun. 63:1739-1744.
162. **Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron, and I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. Infect. Immun. 64:4549-4556.
163. **Tsolis, R. M., A. J. Baumler, I. Stojiljkovic, and F. Heffron.** 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron- regulated genes. J. Bacteriol. 177:4628-4637.
164. **Uchiya, K., M. A. Barbieri, K. Funato, A. H. Shah, P. D. Stahl, and E. A. Groisman.** 1999. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. EMBO J. 18: 3924-3933.
165. **van der Velden, A. W., A. J. Baumler, R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. Infect. Immun. 66:2803-2808.

-
166. van der Velden, A. W., S. W. Lindgren, M. J. Worley, and F. Heffron. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect. Immun.* **68**:5702-5709.
167. Vazquez-Torres, A. and F. C. Fang. 2000. Cellular routes of invasion by enteropathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:54-59.
168. Vazquez-Torres, A. and F. C. Fang. 2001. Oxygen-dependent anti-*Salmonella* activity of macrophages. *Trends Microbiol.* **9**:29-33.
169. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, A. J. Baumler, S. Falkow, R. Valdivia, W. Brown, M. Le, R. Berggren, W. T. Parks, and F. C. Fang. 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature* **401**:804-808.
170. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, P. Mastroeni, H. Ischiropoulos, and F. C. Fang. 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*. *J. Exp. Med.* **192**:227-236.
171. Vazquez-Torres, A., Y. Xu, J. Jones-Carson, D. W. Holden, S. M. Lucia, M. C. Dinauer, P. Mastroeni, and F. C. Fang. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **287**:1655-1658.
172. Via, L. E., D. Deretic, R. J. Ulmer, N. S. Hibler, L. A. Huber, and V. Deretic. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by *rab5* and *rab7*. *J. Biol. Chem.* **272**:13326-13331.

-
173. Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* **73**: 469-485.
174. Vidal, S. M., E. Pinner, P. Lepage, S. Gauthier, and P. Gros. 1996. Natural resistance to intracellular infections: *Nramp1* encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nramp1* D169) mouse strains. *J. Immunol.* **157**:3559-3568.
175. Vokes, S. A., S. A. Reeves, A. G. Torres, and S. M. Payne. 1999. The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Mol. Microbiol.* **33**:63-73.
176. Wai, S. N., K. Nakayama, K. Umene, T. Moriya, and K. Amako. 1996. Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **20**:1127-1134.
177. Wall, P. G., D. Morgan, K. Lamden, M. Ryan, M. Griffin, E. J. Threlfall, L. R. Ward, and B. Rowe. 1994. A case control study of infection with an epidemic strain of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **4**:R130-R135.
178. Wyckoff, E. E., D. Duncan, A. G. Torres, M. Mills, K. Maase, and S. M. Payne. 1998. Structure of the *Shigella dysenteriae* haem transport locus and its phylogenetic distribution in enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* **28**:1139-1152.

179. Zhou, D., W. D. Hardt, and J. E. Galan. 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect. Immun.* **67**:1974-1981.
180. Zhou, D., M. S. Mooseker, and J. E. Galan. 1999. An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:10176-10181.
181. Zhou, D., M. S. Mooseker, and J. E. Galan. 1999. Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science* **283**:2092-2095.
182. Zwillig, B. S., D. E. Kuhn, L. Wikoff, D. Brown, and W. Lafuse. 1999. Role of iron in *Nramp1*-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect. Immun.* **67**:1386-1392.

Annexe 1 : Figure 5

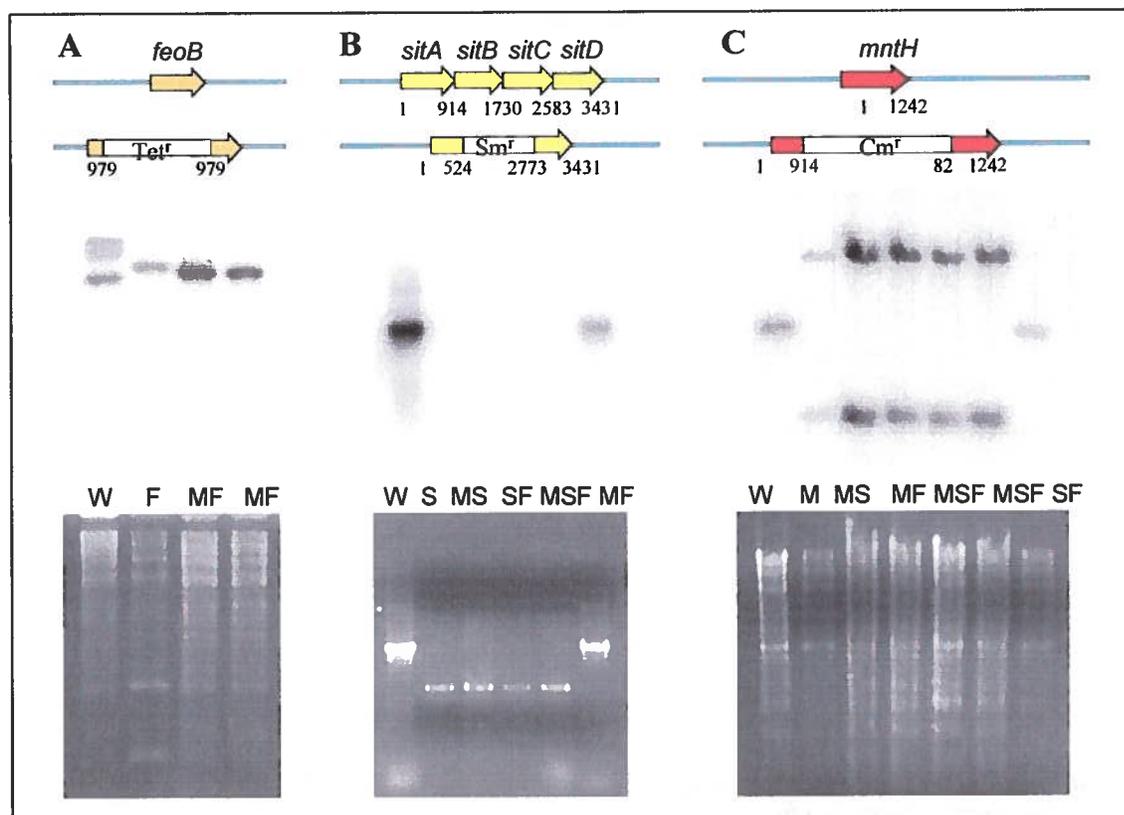


Figure 5 : Inactivation des gènes *feoB*, *sitABCD* et *mntH* chez *S. typhimurium* keller

Vérification de l'inactivation des gènes *feoB* (A), *sitABCD* (B) et *mntH* (C) de *Salmonella typhimurium*, souche Keller par analyse de type « Southern blot ». Partie supérieure : les graphiques symbolisent les processus d'inactivation employés conduisant au remplacement de tout (B) ou partie (A) des opérons ciblés avec une cassette de résistance à un antibiotique (tétracycline (A), streptomycine (B)) ou à l'interruption du gène par une cassette de résistance au chloramphénicol (C). Les chiffres indiqués correspondent à la position exprimée en nombre de paire de base par rapport à la première base du codon de départ chez *S. typhimurium* (B et C) ou par rapport au gène de *E. coli* (A). Partie centrale : résultats des hybridations avec des sondes marquées au ^{32}P correspondant à un fragment interne du gène *feoB* (A), à une fraction des gènes *sitB* et *sitC* (B) et à une portion interne du gène *mntH* (C) obtenus par autoradiographie. Partie inférieure : coloration au bromure d'éthidium des gels d'agarose montrant la résolution par électrophorèse des fragments d'ADN génomiques des souches analysées et digéré avec EcoRI (A et C) et de ceux obtenus par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'amorces spécifiques pour l'opéron *sitABCD*.

W, *S. typhimurium* keller souche d'origine, M, *mntH*, S, *sitABCD*, F, *feoB*, MS, *mntH sitABCD*, MF, *mntH feoB*, SF, *sitABCD feoB*, MSF, *mntH sitABCD feoB*.

Annexe 2 : Figure 6

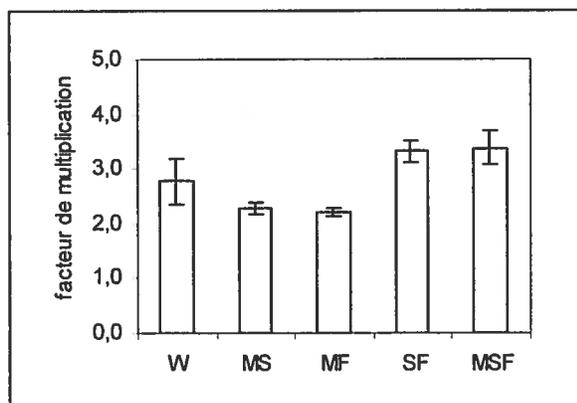


Figure 6 : Détermination de la réplication intracellulaire de 5 souches de *S. typhimurium* dans la lignée RAW 264.7 incubée en présence de 65 μM de BPS. Le facteur de multiplication consiste en le rapport entre le décompte des unités viables après 4 heures post-infection et le décompte des unités viables obtenues après infection. Les cellules ont été incubées pendant 17 heures dans du milieu DMEM contenant 100 U/mL d'IFN- γ avant d'être infectées dans un rapport d'une bactérie pour 100 cellules.

W, *S. typhimurium* keller souche d'origine, MS, *mntH sitABCD*, MF, *mntH feoB*, SF, *sitABCD feoB*, MSF, *mntH sitABCD feoB*.

La moyenne de deux expériences indépendantes est présentée.

Annexe 3 : Figure 7

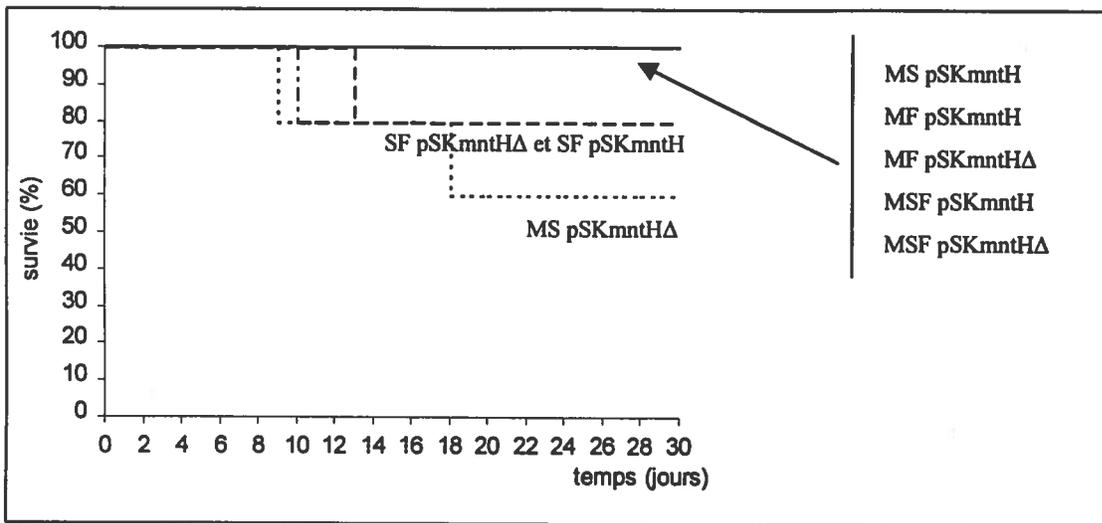


Figure 7 : Survie des souris 129/Sv *Nramp1*^{-/-} après injection intra-veineuse de 10³ bactéries. Les animaux ont été observés une fois par jour, à heure fixe, pendant une période de trente jours. Cinq animaux ont été testés pour chacune des 8 souche de *S. typhimurium* à l'étude : MS pSKmntH, MS pSKmntHΔ, MF pSKmntH, MF pSKmntHΔSF, SF pSKmntH, SF pSKmntHΔ, MSF pSKmntH et MSF pSKmntHΔ. Le plasmide pSKmntH comprend le cadre de lecture complet du gène *mntH* de même que la région du promoteur. Le plasmide pSKmntHΔ est dérivé du plasmide pSKmntH, mais possède une version tronquée du cadre de lecture du gène *mntH*.

MS, *S. typhimurium* keller *mntH sitABCD*, MF, *mntH feoB*, SF, *sitABCD feoB*, MSF, *mntH sitABCD feoB*.

Annexe 4 : Article

Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Boyer E.¹, Bergevin I.¹, Malo D.², Gros P.³ & M.F.M. Cellier*¹

¹Department of Human Health, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval H7V 1B7, Québec, Canada

²Center for the Study of Host Resistance, McGill University, Montreal General Hospital, Montreal H3G 1A4, Quebec, Canada

³Department of Biochemistry, McGill University, Montreal H3G 1Y6, Quebec, Canada

* Corresponding author :

531, boul des Prairies

Laval (Québec)

Canada

H7V 1B7

tel : (450) 687-5010 ext. 4681

fax : (450) 686-5501

mathieu.cellier@inrs-iaf.quebec.ca

Running Title: Fe²⁺ and Mn²⁺ transporters in *S. typhimurium* infection

Abstract

The role in *Salmonella* pathogenicity of the genes *feoB* (F, ABC ferrous iron transporter), *mntH* (M, proton-dependent manganese transporter) and *sitABCD* (S, putative ABC iron and/or manganese transporter) was investigated using mutant strains deficient in one, two or three transporters that were compared with the wild-type. Results indicated that *sitABCD* encodes an important transporter of Mn(II) and Fe(II), required for full virulence in susceptible animals (*Nramp1*^{-/-}) and for replication inside *Nramp1*^{-/-} macrophages *in vitro*. The double mutant *mntH sitABCD* (MS) showed minimal Mn(II) uptake, increased sensitivity to H₂O₂ and to the divalent metal chelator 2,2'-dipyridyl (DP) and defective replication in macrophages. In vivo MS appeared as virulent as S in *Nramp1*^{-/-} animals. The ferrous iron transporter Feo was required for full virulence in 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice, and infection with multiple mutants lacking FeoB were not fatal. The mutants *sitABCD feoB* (SF) and *mntH sitABCD feoB* (MSF) showed minimal Fe(II) uptake and were slightly impaired for replication in susceptible macrophages. MSF showed limited growth in minimal medium limited in divalent cations. The role of the *mntH* gene, homologous to *Nramp* genes, was also investigated by over-expression. MntH preferred Mn(II) over Fe(II), and could suppress MS sensitivity to H₂O₂ and to DP, and also improved the intracellular survival of MS in *Nramp1*^{-/-} macrophages. This study indicates that acquisition of Mn(II), in addition to Fe(II), is required for intracellular survival and replication of serovar Typhimurium in macrophages, and for full virulence *in vivo*.

Introduction

Salmonella enterica serovar Typhimurium (serovar Typhimurium) produces an infection in mice resembling the typhoid fever caused by Serovar Typhi in humans. After oral ingestion, serovar Typhimurium colonises the small intestine, penetrates the intestinal epithelium through specialized M cells that sample intestinal antigens, and enters Peyer's patches. From these lymphoid structures, bacteria spread to the general circulation via the lymphatic system, where they are rapidly taken up by phagocytes including spleen and liver macrophages (28). Mouse strains highly susceptible to intravenous serovar Typhimurium infection show important deficiencies in their innate immunity including microbicidal functions such as the Natural resistance associated macrophage protein 1 (Nramp1). Mice homozygous for the mutation G169D in the gene encoding Nramp1 (24) are unable to control serovar Typhimurium intracellular replication due to the absence of a functional Nramp1 protein at the phagosomal membrane (12, 13). Nramp1 protein normally functions as an efflux pump to deplete the phagosomal space of divalent cations such as Mn(II) in a proton- and pH-dependent manner (16).

15

Enterobacteriaceae are versatile micro-organisms which can survive in a variety of hostile environments, including conditions of reduced bio-availability of iron. This vital redox element, is necessary for the energy metabolism and resistance to oxidative stress of most cells, although some microbes may prefer manganese in place of iron (30). *Escherichia coli* and *S. enterica* do not seem to require Mn for growth in laboratory conditions but are strongly dependent on iron. As a result of adaptation to various environments and growth conditions, including those encountered by virulent pathogens, these bacteria have maintained in their genome, or acquired through horizontal gene transfer, a variety of iron uptake systems (14, 32). Iron availability is affected by

the environmental conditions. At neutral pH in aerobiosis, ferric iron(III) is insoluble. In these
25 conditions, bacteria including *Enterobacteriaceae* depend on siderophores to capture and uptake
sufficient iron. In anaerobiosis or reducing conditions, ferrous iron(II) is the predominant form
and is acquired via Fe(II) uptake systems (32).

The TonB protein is required to energise the active accumulation of different substrates including
30 Fe(III)-siderophores, heme proteins and siderophilins via specific outer membrane receptors (32).
Mutations in *tonB* block the energy transfer from the cytoplasmic membrane to the outer
membrane receptor of Gram negative bacteria (27). Once released in the periplasm, the Fe(III)-
containing complexes are transported into the cytoplasm via periplasmic binding protein-
dependent transport systems (PBP-DTS), which are energised through ATP hydrolysis (e.g.
35 *fepBCDG*). In contrast Fe(II) diffuses freely to the inner membrane. In *E. coli* Fe(II) uptake is
performed by the ATP-driven high affinity transporter FeoABC (19) or the proton-dependent
MntH (23), and in certain conditions by CorAD (15).

Previous studies showed that serovar Typhimurium *feoB* mutants were outcompeted by the wild
40 type during mixed colonization of the mouse intestine, but disruption of the *feoB* gene did not
attenuate serovar Typhimurium for oral or intraperitoneal infection of Balb/c mice (34). The *tonB*
mutation attenuated serovar Typhimurium for infection of mice by the intragastric route and it
was suggested that TonB-mediated uptake was required for colonization of the Peyer's patches
and mesenteric lymph nodes. A *tonB feoB* double mutant injected intraperitoneally was able to
45 infect the liver and spleen using a dose similar to wild-type *Salmonella*, indicating further
redundancy in iron acquisition systems for successful infection *in vivo* (34).

One such complementary system may be the *sitABCD* operon, located on *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (37). *sitABCD* encodes a member of a novel family cluster of the ABC transporter superfamily of prokaryotic binding protein-dependent transport systems (PBP-DTS). This family cluster is specific for metal ions. Homologous transport systems were described in other Gram positive and Gram negative pathogens (2, 4, 9, 37). In *Yersinia pestis* the transport system YfeAD transports both Fe and Mn and is required for full virulence in mice (3). Serovar Typhimurium SitABCD transport system is also required for full virulence in mice (18) but whether it transports divalent metal ions Fe (II) and Mn(II) remains to be established.

Another candidate metal permease possibly important for host colonization by serovar Typhimurium is the Nramp homolog, denominated MntH, for proton-dependent manganese transporter. The MntH/Nramp family is thought to have appeared in prokaryotes, and to have been maintained in eukaryotes and further diversified through gene duplication (7). In mammals, the Nramp1 protein is required for proper maturation of the phagosome in professional phagocytes (13), and to acquire manganese from the phagosome (16). In Gram positive and Gram negative bacteria, MntH proteins were also characterised as manganese permeases acting on Mn and other divalent metal ions including ferrous iron (1, 20, 23, 31). These studies suggested that the homologous bacterial MntH and macrophage Nramp1 proteins could function in direct competition at the level of the phagosome for acquiring Mn and maybe other divalent metals.

We inactivated three loci of serovar Typhimurium that are known or presumed to be important for divalent cation acquisition, and evaluated the virulence of mutant bacteria in mice bearing either wild-type or loss-of-function mutation at the *Nramp1* locus. The bacterial mutants were

also phenotyped *in vitro* to investigate their resistance to various stresses, including growth in metal-limited media, exposure to H₂O₂, and survival and intracellular replication in macrophages.

Material and Methods

Biochemicals : Antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, gentamycin, kanamycin), metal chelators [2,2'-dipyridyl (DP), bathophenanthroline-disulfonic acid (BPS), Ferrozine, Nitrilotriacetic acid (NTA)], buffers except Hepes, L(+)-arabinose , 2-deoxyglucose
5 and carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone (CCCP) were purchased from Sigma Co. (St-Louis, MO). Other biochemicals were from ICN (Costa Mesa, CA). Enzymes for molecular biology were from Pharmacia (Peapack, NJ) or New England Biolabs (Beverly, MA) except *Pfu* DNA polymerase from Stratagene (La Jolla, CA) and *Taq* DNA polymerase from Gibco BRL (Life Technologies, Grand Island, NY). Dulbecco's Modified Earle's Medium (DMEM), HEPES
10 were from Gibco BRL and fetal calf serum FCS was from (HyClone, Logan, UT). 24-well plates from Falcon (Becton Dickinson, Sparks, MD) and IFN-gamma from Cedarlane (Hornby, Ont, Canada). Radioisotopes were purchased from NEN (life science products, inc., MA)

Targeted disruption of mntH, sitABCD, and feoB genes of serovar Typhimurium isolate Keller (Ref.
15 strain for *Nramp1* phenotyping; 33): The *mntH* gene was inactivated by insertion-duplication within the coding region. A suicide plasmid derived from the plasposon pTnMod-RCm (10) was used to clone a fragment of serovar Typhimurium *mntH* orf, encoding a truncated protein lacking both N- and C-termini (aa 28-305). The DNA fragment was amplified by PCR using the oligonucleotide primers EB1F (5'- TTC GCG GCC GCG ATT GGT TAT ATC) and EB1R (5' GTG GGT ACC
20 ACA GTG GAG GAA and cycling parameters : (94°C 1min, 57 °C 1min, 72 °C 1min) x 5 and (94 °C 1min, 67 °C 1min, 72 °C 1min) x 25. The resulting 848 bp fragment was digested with restriction enzymes *Not* I and *Kpn* I, gel purified, and ligated using T₄ DNA ligase to the plasposon pTnMod-RCm backbone (R6K, Cm^R) obtained by restriction with *Not* I and *Kpn* I enzymes and gel

purification. The recombination product, p2003-*mntH*, was cloned, purified and digested with *Xba* I
25 enzyme before ligation to a *Xba* I DNA fragment corresponding to the RP4 oriT (10). This fragment
was produced by PCR amplification using pTnMod-RCm as template, with the oligonucleotide
primers RP4F (5'-GTC TAG AAT TCT ACT GTT TGG G) and RP4R (5' GAT CTA GAT CTG
ATC GGC CC) and cycling parameters (94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min 15 sec) x 5 (94 °C 1
min, 58 °C 1 min, 72 °C 3 min 15 sec) x 5 and (94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 3 min 15 sec) x 25.
30 The resulting construct (p2003-*mntH*-RP4) was cloned and introduced into serovar Typhimurium by
conjugation; 500 µL of log phase culture of each donor and recipient strains strain was concentrated
10 fold in Luria-Bertani (LB) medium, spread onto a non-selective LB plate, and incubated for 16h
at room temperature. The cell lawn was resuspended in 2 mL of LB and serial dilutions were plated
on Bismuth agar plates (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD) containing 10 µg/mL of
35 chloramphenicol. Serovar Typhimurium ex-conjugants were identified as black colonies (Bis⁺)
resistant to chloramphenicol (Cm^R). Genomic DNA of positive clones was purified and used for
PCR and Southern analyses. DNA from all the clones Bis⁺ Cm^R failed to yield a PCR amplification
product with the oligonucleotides STyFN(5'-AAC CAT GGC TGA CAA TCG CGT AGA GA) and
STyRX(5'-GTT CTA GAA TCG GGC CTG CTA TCT), whereas DNA from wild-type serovar
40 Typhimurium yielded a fragment of the expected size (1242 bp), using cycling parameters (94 °C 45
sec, 60 °C 45 sec, 72 °C 2 min) x 8 and (94 °C 45 sec, 67 °C 45 sec, 72 °C 2 min) x 25. All the clones
Bis⁺ Cm^R were positive for PCR with the oligonucleotide primers EB1F and EB1R and cycling
parameters (as described above), and also with primer pairs EB1F/StyRX, and StyF/EB1R, using
same cycling parameters. One clone Bis⁺ Cm^R was further verified by Southern analysis after
45 digestion of the genomic DNA with *EcoR* I and hybridization with a *mntH* probe obtained by PCR
with oligonucleotide primers EB1F and EB1R. As expected a specific band of ~ 2.5 kb was obtained

for serovar Typhimurium strains possessing a wild-type allele of *mntH*, whereas two bands around 6 kb and 1 kb were obtained for strains in which *mntH* gene had been targeted by insertion. P22 transduction of the *mntH* Cm^R allele yielded the double mutants *mntH feoB*, *mntH sitABCD* and the triple mutant *mntH sitABCD feoB* which were identified by the same *mntH* hybridization pattern with two *EcoR* I bands in all the clones tested.

The *feoB* mutagenesis was also performed in serovar Typhimurium Keller because this mutation could not be transduced with P22 from the ATCC 14028 background (34). The *feoB* gene was inactivated by replacement of the wild-type allele with a copy interrupted by a tet^R cassette, using the construct previously described (kind gift of R. Tsohis), as indicated (34). The *feoB* mutation was verified by PCR amplification and observation of a ~2.9 kb DNA fragment due to insertion of the tet^R cassette instead of the ~0.9 kb DNA fragment obtained with wild-type serovar Typhimurium *feoB* gene. This was confirmed by Southern analysis using a *feoB* specific probe and observation of an *EcoR* I restriction fragment length polymorphism between DNA from wild-type *Salmonella* and the *feoB* mutant. As only a single *feoB* mutant could be obtained, double mutants *feoB mntH* were produced by transduction using a P22 lysate carrying copies of the Cm^R *mntH* allele, and double mutants *feoB sitABCD* were created by inactivation of the *sit* operon in the *feoB* mutant.

The wild-type *sitABCD* operon was exchanged with an altered copy in which an internal fragment spanning the end of *sitA* orf, the whole *sitB* and *sitC* and the beginning of *sitD* orf was replaced by a Sm^R cassette. The 5' part of the operon was PCR amplified with the oligonucleotide primers SitAF (5'-AAT GCG GCG GCA CCG TTG ACG CCT) and SitAR (5'-GGC GGA TCC GCC ATC TGG CGA ATT T), and *Taq* I polymerase and cycling parameters (94°C 1 min, 63 °C 1 min, 72 °C 1min) x 9 and (94 °C 1 min, 75 °C 1 min, 72 °C 1min) x 26. The amplification product was digested with

restriction enzymes *Not* I and *Bam*H I, gel purified and cloned in the vector pBluescript KS+. The 3' part of the operon was similarly PCR amplified with the oligonucleotide primers SitDF (5'-TGG CGC GGG GAT CCC CCT GGC GA) and SitDR (5'-TTA AGC TTG CGG CCG CCA AAA AAC TTC A), and *Taq* I polymerase and cycling parameters (94°C 1 min, 61 °C 1 min, 72 °C 1min 20 sec) x 9 and (94 °C 1 min, 77 °C 1 min, 72 °C 1min 20 sec) x 26. The DNA fragment obtained was digested with *Bam*H I and *Hind* III and cloned into pKS-sitA. A streptomycin resistance cassette (kind gift of Dr JG Zylstra) was inserted at the internal *Bam* HI site. The final construct was transferred to the pKO3 plasmid to perform allelic exchange in the wild type and *feoB* background, as previously described (22) (23). Deletion of the *sit* operon was verified by PCR analysis using genomic DNA as template, the oligonucleotide primers SitSmF (5'-GGA TAA TGC GCA GAT CTA) and SitSmR (5'-GCT GTT ATC GTC CAG ATA) and cycling parameters (94°C 1 min, 47 °C 1 min, 72 °C 2 min 30 sec) x 25 with the *Taq* DNA polymerase. After agarose gel electrophoresis of the reaction products fragments of ~2.4 kb and ~1.35 kb were observed for the wild-type and the *sit* mutants, respectively. Southern blotting of the PCR reaction products using a probe corresponding to the deleted portion of *sit* operon (*Sma* I-*Cla* I fragment) demonstrated the absence of specific signal in all the *sitABCD* mutants tested.

Culture conditions for bacteria: Bacteria were grown in culture media Luria-Bertani (26), tryptone soy broth (Difco, division of Becton Dickinson, Sparks, MD) or minimal medium as indicated, and at 37°C and 220 rpm unless otherwise specified. The minimal medium G/M was prepared as described (23) and buffered at pH 7.4 with MOPS. Sterile 15 mL polystyrene tubes (Simport, Beloeil, Qc, Canada) were used for cultures in G/M medium. Saturated cultures in LB containing the required antibiotics were used to inoculate LB without antibiotics. Cultures were further incubated

for 8 h and used to inoculate (1/100) G/M medium containing 10 μ M of added iron (1X) and no
95 other micro-nutrients. After 24 h, 1 mL of culture was centrifuged at 9000 rpm for 1 min. Pelleted
cells were washed in 5 mM EDTA and washed in G/M medium without added iron and micro-
nutrients before resuspension in the same G/M medium. These cells were used to inoculate G/M
medium containing defined amounts of added iron and manganese (initial optical density at 600 nm
(OD₆₀₀) =0.05). Growth was estimated by measuring the OD₆₀₀ reached after 17 h of culture and
100 colony forming unit (CFU) determination on LB plates by plating serial dilutions of the liquid
cultures. For metal uptake measurements, saturated cultures in LB medium were washed in G/M
without micro-nutrients or iron added and resuspended in G/M medium (0.001X) containing 10 nM
of added iron and incubated for 2h and 15 min. 500 μ M ferrozine was added to the medium and the
cultures were further incubated for 45 min and stopped on ice before processing the cells for uptake
105 experiments.

Assay of sensitivity to H₂O₂. Saturated cultures in LB containing the required antibiotics were used
to inoculate (1/100) fresh LB medium without antibiotics and incubated until OD₆₀₀≥0.35. These
cultures were further incubated for 45 min in presence of 200 μ M DP; 100 μ L of this culture was
110 mixed to 3 mL of molten top agar and poured onto LB plates. A 7 mm Whatman filter disk
impregnated with 10 μ L of 30.4 % hydrogen peroxide (H₂O₂) was placed in the center of the plate
before incubation for 17 h at 37°C.

Uptake measurement : Bacteria starved for divalent metals by incubation in G/M medium
115 containing 10 nM of added iron and 500 μ M ferrozine were washed and treated to permeabilize
the outer membrane as previously described for *E. coli* (23). Uptake medium (40 mM MOPS pH

7.4, 5 mM Na, β -glycero-PO₄, 5 mM MgSO₄, 0.2 % glucose, 0.1 mM NTA, 1 mM Na-Ascorbate) was used with ⁵⁵Fe(II) and ⁵⁴Mn(II) isotopes (specific activity 6.5 Ci mmol⁻¹ and 4.1 Ci mmol⁻¹, respectively). Fe(II) or Mn(II) were added at a final concentration of 3 μ M (final specific activity 65 mCi mmol⁻¹ and 41 μ Ci mmol⁻¹, respectively). Uptake was measured by quick filtration assay as previously described (23).

In vivo infections: Inbred mouse strains 129/SvJ obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) were bred and maintained in our animal facilities under conditions specified by the Canadian Council on Animal Care. Infection of 129/Sv and 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice were performed as previously described (36). The day before infection, 1 mL aliquots of 25% glycerol stocks were used to inoculate 100 mL of TSB and incubated until an OD₆₀₀ between 0.1-0.2 was reached. The cultures were stopped on ice and serial dilutions in NaCl 0.9% were plated on LB plates to evaluate the CFU/mL. The next day, bacterial suspensions were adjusted at 5x10³ CFU/mL in NaCl 0.9% prior to injection of 200 μ L in the tail vein of the animals. Serial dilutions of these suspensions were plated to determine the effective infectious doses. Animals were examined every day for 30 days to determine the mortality due to the infection. Animals that had to be sacrificed were counted dead by infection on the next day.

In vitro macrophage infections: The protocol used was adapted from previous studies (12) (21). Two cell lines were used: the macrophage-like Raw 264.7 (ATCC TIB) which is naturally devoid of a functional Nramp1 protein, and the clone 13 derived from it, which expresses high levels of functional Nramp1 protein (12). Cells were grown in DMEM, 10 % FCS, 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The day before infection, saturated

140 cultures in LB were used to inoculate (1/50) 2 mL of LB standing cultures at 37°C, and the
macrophage-like cells were seeded in 24-well plates at 10⁶ cells/mL of DMEM containing 10 %
inactivated FCS and 100U/mL IFN-g. Bacterial standing cultures were adjusted to OD₆₀₀=0.9, or
OD₆₀₀=0.95 for the MSF mutant, and diluted in G/M medium to obtain 10⁵ bacteria/mL and 10⁶
145 bacteria/mL for infection of *Nramp1*^{-/-} and *Nramp1*^{+/-} cells, respectively. Macrophage-like cells
were infected by adding 5 µL of diluted bacteria to 500 µL of cells (multiplicity of infection,
m.o.i. = 0.01 for *Nramp1*^{-/-} and 0.1 for *Nramp1*^{+/-} cells). The effective infectious dose was
determined by plating serial dilutions of these suspensions of bacteria. After 2 h of incubation at
37°C, excess bacteria were removed and washed twice with PBS. Infected cells were further
incubated for 1 h in warm medium containing 100 µg/mL gentamycin, a concentration inhibiting
150 the growth of all bacterial strains under study. After one hour incubation in the presence of 100
µg/mL gentamycin, cells were washed twice with PBS and either lysed (Time point 0 h) or
further incubated for four hours at 37°C in the presence of 10 µg/mL gentamycin, before lysis
(T=4 h). Cells were lysed by adding 500 µL of PBS-1% Triton X100, incubating 5 min at 37°C
and aspirating the lysate several times with a micropipet. Serial dilutions of the lysate were plated
155 for CFU determinations. In some experiments with *Nramp1*^{-/-} cells, ferrous iron chelators were
added to the culture medium immediately before infection and remained for the duration of the
experiment. The membrane-permeant chelator DP and the membrane-impermeant chelator BPS
were used at a concentration of 65 µM, which was determined to be non toxic for the cells after 8
h of incubation in DMEM. This concentration did not influence bacterial growth in LB.

160

Phenotypic complementation of the mutant MS by the mntH gene: A full-length *mntH* gene
expressed under the control of its own promoter was cloned in pBluescript SK+ using a DNA

fragment amplified by PCR. Genomic DNA from serovar Typhimurium isolate Keller was used with the *Pfu* DNA polymerase and oligonucleotide primers pmntHF (5'-GTT CTC GAG GAT CCA GGC CAG TAA TAC T) and Styr (GTT CTA GAA TCG GGC CTG CTA TCT), and the
165 cycling parameters : (94°C 1 min, 61°C 1 min, 72 °C 4min) x 6 and (94 °C 1 min, 67 °C 1 min, 72 °C 4min) x 25. A single band around 1.70 kb (1763 bp) was observed by agarose gel electrophoresis and gel-purified after digestion with restriction enzymes *Xba* I and *Bam*HI. The purified DNA fragment was ligated to the plasmid pBluescript SK+ using the T₄ DNA ligase.
170 Two independent recombinant clones were selected for use in complementation assays. As a negative control the plasmid pSKmntHΔ was generated by deletion of an internal portion of *mntH* orf using the restriction enzyme *Sac* II followed by intramolecular ligation. The two plasmids pSKmntH and pSKmntHΔ were introduced in all the double mutants and the triple mutant MSF, and the resulting phenotypes (divalent metal ion uptake, growth in LB medium
175 containing DP, sensitivity to H₂O₂, intracellular replication in Raw cells) were analysed.

Results

MSF is deficient in Fe(II) and Mn(II) uptake and shows decreased growth in minimal medium limited in metal ions.

To assess the role of *feo*, *sit* and *mntH* loci in divalent cation uptake and virulence, strains of serovar Typhimurium carrying mutations in *feoB* (F), *sitABCD* (S) and *mntH* (M) were constructed by allelic exchange and insertion-duplication mutagenesis, respectively. To identify potential compensatory functions between these transporters, the double mutants *mntH feoB* (MF), *mntH sitABCD* (MS) and *sitABCD feoB* (SF), and the triple mutant *mntH sitABCD feoB* (MSF), were generated. The *tonB* mutation which inactivates several siderophore-dependent Fe(III) uptake systems in *S. enterica*, was used as a control system of non-divalent metal uptake. The double mutant *mntH tonB* (MT) was also generated.

Growth of each mutant strain was compared with that of the parental wild-type (W) in undefined rich medium (LB), both liquid and solid. There were no notable differences, only a slight decrease in the number of CFU per OD was noted for MSF. This suggested that metal ions like iron and manganese remained available to the mutant strains grown in LB medium. The effect of the multiple mutations MS, MF, SF and MSF on growth in defined minimal medium (G/M) containing limiting amounts of added iron and manganese was therefore investigated.

Although growth of wild-type serovar Typhimurium (W) was affected by the level of iron availability, bacteria could still grow substantially in G/M containing only 1 nM of added iron and no added micro-nutrients (Co, Cu, Mn, Zn), reaching an OD₆₀₀ ~ 1 after 17h of aerated culture (Fig. 1A). The double mutants MS and MF showed no difference in growth compared

with W at any given concentration of iron tested, whereas cultures of SF consistently reached
25 higher OD (e.g. Fig. 1B, no Mn added). However, when iron concentration was reduced to 100
nM and below, the triple mutant MSF had decreased growth compared to W (Fig. 1A, $P < 0.01$).
These results indicated that iron restriction reduced the growth of MSF compared to strains
possessing at least one of the transporters studied, and that the presence of MntH correlated with
higher OD (Fig. 1A) and CFU numbers (data not shown).

30

Addition of Mn or the presence of *mntH* gene are required for growth of the Gram positive *B.*
subtilis in minimal medium (31). We determined whether Mn influenced the growth of the
mutants strains of serovar Typhimurium in conditions of limited iron availability. Mn addition
had a significant positive effect on growth of the wild-type and mutant strains MF and SF. A
35 much more limited effect of Mn addition was observed on growth of the strains MS and MSF
(Fig. 1B, e.g. $P < 0.01$ with 1 μ M and 0.1 μ M Mn added). This suggested that Mn addition could
stimulate the growth of serovar Typhimurium in iron-limiting conditions, and that mutants MS
and MSF may lack Mn uptake systems.

40 Direct evidence of a role in divalent metal transport of the genes studied was obtained by
measuring temperature-dependent uptake, using bacteria 'starved' for metals to stimulate the
expression of the transporters (see Materials and Methods). Metal uptake measurements were
performed at 37°C and +4°C to discriminate between active transport and external binding for
each individual strains.

45

Mutants MS and MSF appeared totally deficient in Mn(II) transport (<1 pmol/OD1, Fig. 1C). S and SF strains exhibited low levels of Mn(II) accumulation (~6 pmol/OD1, Fig. 1C), presumably through the MntH transporter. MntH-dependent Mn uptake was under-estimated in these measures performed at pH 7.4 since MntH is pH- and proton-dependent transporter (20, 23). A
50 ~70 % increase in Mn uptake would be expected at pH 6, based on studies in *E. coli* strain lacking the F1/F0 ATPase (I. Bergevin and M. Cellier, unpublished data). Abrogation of Mn(II) transport after preincubation with 8 µM of the membrane protonophore CCCP was observed only with strains S and SF, indicating that MntH-dependent transport is sensitive to the membrane potential of (data not shown). These results indicate *sitABCD* and *mntH* encode two high affinity
55 Mn transporters in serovar Typhimurium and that SitABCD may be more important.

Mutants SF and MSF showed low level of temperature-dependent Fe(II) uptake in the conditions tested (17 pmol/OD1 and 13 pmol/OD1, respectively, Fig. 1D), whereas single mutants M, S, F exhibited uptake levels close to the wild-type. These data suggest that the ABC-type systems Feo
60 and Sit may compensate for each others for Fe(II) uptake. The double mutant MF exhibited a normal uptake capacity for Fe(II) (~90 pmol/OD1, Fig. 1D), and also showed the highest levels of Mn(II) accumulation (~ 70 pmol/OD1, Fig. 1C). This could be due to up-regulation of the SitABCD transport system, which would compensate the inactivation of both *feoB* and *mntH*. These data indicate both *sitABCD* and *feoB* encode high affinity Fe(II) transporters in serovar
65 Typhimurium.

These results indicate that the inactivation of either *feoB*, *sitABCD* or *mntH* genes had an impact on the divalent metal uptake capacity of serovar Typhimurium, and that strains MS, SF and MSF

showed important deficits in Mn(II) and/or Fe(II) acquisition. These strains were used to examine
70 the role of divalent metal transport on the virulence of serovar Typhimurium.

Salmonella strains deficient in divalent metal ion uptake are attenuated in vivo and in vitro

The effect on virulence of the mutations in genes *mntH*, *sit*, *feo* and *tonB* was tested in a mouse
typhoid model, using animals differing in susceptibility to infection due to the presence or
75 absence of a functional *Nramp1* gene. Nine different mutant strains and the wild-type serovar
Typhimurium were injected intravenously and the mortality due to infection was scored during a
period of 30 days.

All *Nramp1*^{+/+} animals (resistant) controlled the infection as no animal death was observed (Fig.
80 2AB), indicating no remarkable gain of virulence in any of the mutant strains. However, several
mutations affected substantially the median survival times (MeST) of susceptible *Nramp1*^{-/-}
animals. Mice infected with mutants M and T showed MeST similar to mice infected with the
wild-type strain (7 days), whereas mice infected with mutant strains F and S showed markedly
increased MeST (24 and 30 days, respectively). Mice infection with mutant strains F and S
85 differed also in the time elapsed before the first animal death (seven and 18 days, respectively).
These data suggest non-redundant roles for the ABC-type transporters Feo and Sit during
systemic infection.

The double mutant MT maintained full virulence in *Nramp1*^{-/-} animals (MeST of 7.0 days)
90 suggesting that other genes compensated for the inactivation of both *tonB* and *mntH*. MS strain
was significantly attenuated with a MeST of 22 days (Fig. 2B) but infection remained 100% fatal

at the end of the experiment. MS did not appear more attenuated than S (Fig. 2A) as animals seemed to succumb even more rapidly after infection. In contrast, all the susceptible mice infected with either MF, SF or MSF mutants survived during the 30 days of experiment. These data demonstrate that *feoB* mutation impairs the virulence of serovar Typhimurium injected intravenously in *Nramp1*^{-/-} 129/Sv mice. The significant attenuation of the double mutant *mntH* *sitABCD* suggests that Mn acquisition is required for virulence of serovar Typhimurium. The effect of inactivation of *mntH* was dependent on the other mutation to which it was combined.

100 Intravenous *Salmonella* are rapidly taken up by spleen and liver macrophages in which the bacteria replicate to produce a fatal infection. Raw 264.7 macrophages, and a *Nramp1*^{+/-} transfectant (clone # 13) expressing high levels of the protein (12), were used to study the effect of some mutations on the intracellular survival and replication of serovar Typhimurium by Gm^R assay (21). In Raw 264.7 (*Nramp1*^{-/-}) cells, more than threefold replication in 4 h. of intracellular infection was observed for the strains W, MS, SF, MF and MSF showed above, with only non-significant differences between these strains ($P > 0.05$, Fig. 3A). These results indicate that the multiple mutations tested in standard conditions for the Gm^R assay using permissive cells did not modify the intracellular survival and replication of serovar Typhimurium. This result was unexpected considering the attenuation observed *in vivo* with animals permissive to infection.

110 The use of *Nramp1*⁺ Raw macrophages confirmed the *in vivo* data (Fig. 2); all *Salmonella* strains tested, including the wild-type, were unable to replicate during the four-hour assay (Fig. 3B). *Nramp1* is thought to deplete the phagosome, in which *Salmonella* resides, from divalent metal cations. Since iron withholding constitutes a systemic host defense mechanism against infection, we hypothesized that metal-limiting conditions during the intracellular survival assay might be

115

closer to in vivo conditions. We limited the availability of intracellular divalent cations within *Nramp1*^{-/-} permissive macrophages to determine whether the mutant attenuated in vivo showed parallel decrease in resistance to macrophage in vitro.

120 We used the membrane permeant divalent metal cation chelator DP, since it is known to sequester the intracellular labile iron(II) pool and possibly other divalent metal ions, e.g. Co(II) and Mn(II). We also separately observed that the addition of high concentration DP to rich bacterial broth reduced the growth of strain MS, and to a lesser extent that of MSF and S mutants (see Fig. 4C). A DP concentration that had no effect on bacterial growth in rich broth (65 μM)
125 was added to the cell culture medium for the infection of Raw 267.4 *Nramp1*^{-/-} macrophages. The membrane-impermeant chelator BPS was also tested in identical conditions as a negative control. The effect of the Fe(II) chelators on the intracellular growth of *Salmonella* wild-type and mutant strains was estimated by the numbers of CFUs recovered after infection in the presence of these chelators.

130
In presence of BPS, non significant differences in the fold replication were measured between the strains tested and the wild-type (data not shown). Significant differences appeared in presence of DP between some of the strains tested and the wild-type. The strain MS appeared the most sensitive to *Nramp1*^{-/-} macrophages in presence of DP with no replication versus 2.6 fold
135 replication for W in four h. Intracellular growth of the single mutant S was similarly affected ($P<0.01$, Fig. 3C). The presence of DP also slightly decreased the intracellular multiplication of strains SF and MSF ($P<0.05$, Fig. 3C), whereas strain MF appeared unaffected. These results suggest that SitABCD transport system could confer resistance to macrophages in the double

mutant MF and also in strains M, F and W. MntH in SF mutant could also allow limited
140 intracellular replication. Overall, this could point to a role for Mn acquisition during macrophage
infection.

*mntH overexpression complements mntH sitABCD strains for divalent metal uptake, resistance
to peroxide stress and to divalent metal deprivation*

145 The possible role of MntH in intracellular survival and replication was further investigated by
overexpression using a multi-copy plasmid. We first compared the complementation of the
double and triple mutant strains for divalent metal ion uptake by *mntH* gene expressed under the
control of its promoter. A truncated construct lacking most of the coding region was used as
negative control in each strain tested. Over-expression of MntH restored high Mn(II) uptake
150 capacity in the mutants lacking a functional *sitABCD* operon (MS, SF, Fig. 4A). A more modest
up-regulation of Fe(II) uptake due to *mntH* gene expression was also detected in a strain lacking
both *sit* and *feo* genes (SF and MSF, Fig. 4B). Increases in uptake due to MntH overexpression
were small in the triple mutant MSF, indicating an alteration of either general transport capacity
or of *mntH* gene expression in this strain. Hence, MntH over-expression complemented
155 deficiencies in Mn(II) uptake and to a lesser extent in Fe(II) uptake.

The strain MS deficient in Mn(II) uptake appeared sensitive to DP upon subculture in fresh rich
medium containing 200 μ M DP (Fig. 4C). Normal growth of MS was restored by *mntH* over-
expression (Fig. 4C) or by adding 10 μ M of Mn or 50 μ M of Fe to the LB-DP medium (data not
160 shown). Growth of the triple mutant MSF appeared less affected by DP and by MntH over-
expression (Fig. 4C), which was consistent with the limited effect of expression of MntH on

metal transport in MSF (Fig. 4AB). These data obtained with MS mutant suggest that DP impaired the growth of strain MS by diminishing primarily Mn(II) availability.

165 Increased sensitivity to hydrogen peroxide was noted earlier in the Gram positive *Bacillus subtilis* mutant *mntH*, which is deficient in Mn(II) uptake (31). We also observed increased sensitivity to H₂O₂ in *E. coli mntH*, which is also deficient in Mn(II) uptake (data not shown). In serovar Typhimurium, inactivation of both *mntH* and *sitABCD* genes was required to observe H₂O₂ sensitivity (Fig. 4D) and deficiency in Mn(II) uptake (Fig. 1C and 4A). The sensitivity to H₂O₂ in the mutant MS was observed without limitation of metal availability in the disk assay; it was not a secondary consequence of a growth defect such as the one observed in presence of high concentration of DP (Fig. 4C). The sensitivity to H₂O₂ in the mutant MS was corrected by supplementation of the medium with 10 μM Mn (data not shown) or by overexpression of MntH (Fig. 4D). Again, the triple mutant MSF was less sensitive to H₂O₂ and to the expression of
170
175 MntH.

The capacity to grow in Raw 264.7 *Nramp1*^{-/-} in the presence of 65 μM DP was also tested by complementation with *mntH* by comparing the intracellular replication of strains MS(pSKmntH) and MS(pSKmntHΔ). As shown in Fig. 4E, *mntH* gene improved bacterial intracellular survival, and this trend was also observed in *Nramp1*⁺ macrophages (data not shown). These data suggest
180 that *mntH* overexpression facilitates primarily Mn(II) acquisition, contributing to resistance to oxidative stress and metal privation, and possibly also promoting intracellular survival.

Discussion

The main objective of this study was to determine whether divalent metal transporters of serovar Typhimurium were required for infection of a permissive host lacking Nramp1, and to examine in particular the possible contribution of the permease MntH to virulence.

5

The results demonstrated that serovar Typhimurium operon *sitABCD* encodes a major high affinity transporter of both Mn(II) and Fe(II) that is required for virulence in *Nramp1*^{-/-} susceptible animals. There was a good correlation between the disruption of the operon *sitABCD* and an important decrease in Mn(II) uptake (Fig. 1CD), reduced virulence in vivo (Fig. 2A) and increased sensitivity to macrophages in vitro (Fig. 3C). Thus, the *sitABCD* operon is important for divalent metal ion uptake and microbial pathogenesis, similarly to homologous systems described in Gram negative and Gram positive pathogens (2, 4, 9, 17). The strong effect of SitABCD on the virulence of serovar Typhimurium could be due to its capacity to transport both Fe(II) and Mn(II) with high affinity or to high level expression of Sit during infection.

15

An important role for the Fe(II) transport system Feo in the virulence of serovar Typhimurium was shown by the marked negative impact of *feoB* gene disruption on *in vivo* infection (Fig. 2A). However, there was no apparent correlation between this mutation and a diminution of divalent metal uptake (Fig. 1CD), or increased sensitivity to macrophages in vitro (Fig. 3C). The impact of *feoB* mutation on the intravenous infection of 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice by serovar Typhimurium isolate Keller was more important than that observed for the same *feoB* mutation in serovar Typhimurium ATCC 14028, which did not attenuate after oral or intraperitoneal infection of Balb/c mice (34). Whether this difference in attenuation is due to genetic polymorphism between

20

Salmonella isolates or mice inbred strains remain to be established. Our data suggest that *feoB*-
25 dependent Fe(II) uptake is required during infection of 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice. The *Helicobacter pylori* FeoB homolog also constitutes a major pathway for iron(II) acquisition that is important for colonization of the gastric mucosa of mice (35). It is possible that the Feo system is required at a particular stage of infection in the model tested.

30 The attenuation for virulence observed separately with *sit* and *feo* mutations indicate that the encoded ABC-type transport systems are non redundant, due to differences either in function or regulation. The kinetics of animal mortality resulting from infection with these mutants were different, suggesting that the Sit system may be more important during the early stages of infection (Fig. 2A). Interestingly, combination of the mutations *feo* and *sit* had additive effects on
35 reducing Fe(II) uptake in vitro (Fig. 1CD) and abrogating virulence in vivo (Fig. 2B). A slight diminution of bacterial replication within macrophages in vitro was also observed (Fig. 3C). This suggest that reduced acquisition of Fe(II), and possibly also Mn(II), may be the basis for SF avirulence in vivo. Iron is a well-known nutrient essential for microbial growth; Fe and Mn are important co-factors for enzymatic anti-oxidant defenses of several pathogen (e.g. catalase,
40 peroxidase, superoxide dismutases (sod); 6, 8). Thus, transporters FeoAC and SitABCD which are independently required for virulence in 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice could exert complementary roles during infection.

The contribution of *mntH* to virulence appears less important since this mutation did not attenuate
45 virulence either alone or combined with *tonB* (Fig. 2). Also, despite the presence of the functional Mn(II) permease MntH, the double mutant lacking SitABCD and FeoABC systems was avirulent. Lastly, the combination of *mntH* and *sit* mutations, which abolished Mn(II) transport

and increased sensitivity to metal ions restriction and oxidative stress in vitro (Fig. 4C and D), did not result in avirulence. In contrast, despite elevated levels of both Mn(II) and Fe(II) uptake and wild-type level of replication within *Nramp1*^{-/-} macrophages infected in presence of DP (Fig. 50 3C), the combination of *mntH* with *feo* mutation abrogated virulence.

It is intriguing that the presence of a functional Sit transporter in MF correlates with avirulence, whereas the presence of Feo in MS leads to partial attenuation (Fig. 2B). It is possible that 55 different mechanisms operate for attenuation of MS and MF. Inactivation of both MntH and Sit was required to abrogate Mn(II) transport, whereas Fe(II) uptake was significantly diminished by inactivation of both Feo and Sit (Fig. 1CD), suggesting that SitABCD may compensate for the elimination of both MntH and Feo. It would be thus possible that the regulation of Sit is altered in the double mutant MF, which may be in turn detrimental for virulence in the model tested.

60 In contrast, the partial attenuation of MS could be the direct result of deficient Mn(II) acquisition, which affects in vitro bacterial resistance to DP, H₂O₂ and macrophages (Fig. 4CD, and Fig. 3). Attenuation of MS in vivo and within macrophages seemed to result mostly from inactivation of Sit. Of note, inactivation of the orthologous *mntH* gene in *M. tuberculosis* did not attenuate 65 mycobacterial virulence after intravenous infection or increase sensitivity to macrophages in vitro, suggesting no major role of the mycobacterial permease in this mouse model (11). The results obtained so far with *mntH* mutants in serovar Typhimurium do not support a strong role for MntH permease in virulence during the systemic phase of infection. The use of more sensitive measure using mixed infections (5) may be required to show a diminution of virulence due to 70 *mntH* inactivation and better understand the interplay between the transporters studied.

Manganese acquisition appears required for the full virulence of serovar Typhimurium since the double mutant MS is significantly attenuated while it can still acquire Fe(II). The elimination of high affinity Mn(II) transport resulting from inactivation of *mntH* and *sitABCD* correlated with
75 decreased aerobic growth in metal-limiting medium and increased sensitivity to hydrogen peroxide in vitro; overexpression of the permease MntH complemented these defects (Fig. 4). MS showed also impaired intracellular survival in *Nramp1*^{+/} macrophages and deficient replication within permissive macrophages in the presence of DP (Fig. 3). These results are consistent with the observation that Nramp1 extrudes Mn(II) from the phagosome where *Salmonella* resides,
80 preventing its intracellular replication (9, 13), and support an important role of Mn acquisition during *Salmonella* infection.

Addition of Mn(II) to iron-limiting MM stimulated the growth of serovar Typhimurium strains expressing *mntH* and *sitABCD* genes. In *E. coli*, a positive effect of Mn on growth was observed
85 only for strains having a growth defect, apparently resulting from endogenous oxidative stress (I. Bergevin and M. Cellier, unpublished data). Since Mn(II) may be used to scavenge and detoxify superoxides and peroxides either directly or as an enzyme co-factor, its acquisition may improve oxygen-detoxifying capacities of the bacteria, which could consequently grow better. The Mn uptake capacity of serovar Typhimurium could confer a growth advantage when iron supply is
90 limited and favour *Salmonella* pathogenesis.

It was thus surprising to find that MS was only partially attenuated in vivo and could still produce a fatal infection. We expected that this strain being less resistant to metal privation and peroxide stress in vitro would require a delay to reach bacterial titers that induce host death (~10⁸ bacteria).
95 However, this was not observed when comparing the mortality due to infection with MS and S

(Fig. 2A and B). One possibility could be that the sensitivity to DP and H₂O₂ is irrelevant to serovar Typhimurium pathogenesis in vivo, and since increased sensitivity to these agents was correlated to the lack of Mn(II) uptake in MS, this would imply that Mn(II) acquisition is irrelevant to *Salmonella* virulence. This seems inconsistent with the major role of the Sit ABC-type transporter in Mn(II) uptake, resistance to macrophages in vitro and virulence in vivo –
100 which is distinct from and complementary to the ferrous iron transport system Feo. Another possible explanation would be that MS residual virulence results from Mn deficit, which may regulate the expression of virulence factors.

105 Several bacteria, including pathogens, express Mn-dependent transcriptional repressors that function similarly to the regulators Fur and DtxR, which control bacterial response to iron limitation (29). These regulators may be used by pathogens to up-regulate key functions and virulence factors (e.g. toxins, adhesins, and transport systems) in response to host restriction of iron availability during infection (32). In the initial stages of *S. enterica* intravenous infection, a
110 large fraction of bacteria are captured and eliminated by phagocytes, which rely on the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates and expression of Nramp1 to destroy bacteria (25). However, intracellular survival is key to virulence in the murine model of typhoid fever and further studies appear thus warranted to elucidate the role of Mn acquisition in *S. enterica* virulence and intracellular resistance.

115

Iron availability also limited the growth of serovar Typhimurium in vitro although this organism appeared more resistant to metal starvation in minimal medium than *E. coli* K-12 (data not shown). Iron acquisition is critical to pathogenesis to support bacterial growth and provide a vital cofactor to many components of microbial anti-oxidative stress defenses (e.g. Fe-Sod, catalase,

120 peroxidase; 6). Several iron transport systems have been documented in serovar Typhimurium,
which could be required at specific stages during mouse infection (18, 33, 34). The *feoB* gene
appeared to contribute to bacterial growth at intra-intestinal sites, whereas *tonB* gene was
required for subsequent colonization of the Peyer's patches and mesenteric lymph nodes (34),
and *sitABCD* gene was preferentially expressed and required for growth in liver and spleen (18).
125 Using intravenous infection, we confirmed both the important role of *sitABCD* and the absence of
role of *tonB*-dependent uptake systems during the systemic stages of murine infection, and
showed that *feoB* gene can also influence bacterial growth during later stages of infection. These
results support an important role of iron acquisition for the pathogenesis of serovar
Typhimurium.

130

We conclude from this study that i) both *sitABCD* and *feoB* are required for *Salmonella* virulence
during systemic infection of 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice, ii) *mntH* is partially redundant with
sitABCD, and has a comparatively minor effect on *in vivo* and *in vitro* infection, and iii)
acquisition of both Fe(II) and Mn(II) is required for virulent intravenous infection with serovar
135 Typhimurium.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). EB and IB were supported by the Fondation Armand-Frappier and NSERC, respectively. In vivo studies were supported by grants

5 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Howard Hughes Medical Institute (Infectious Diseases and Parasitology Program), and by the NIH grant 1R01 A135237-06 to PG. DM is a scholar of CIHR and an international research scholar of the Howard Hughes Medical Institutes. PG is a international research scholar of the HHMI and a career scientist of the CIHR. MFMC is a scholar of the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec.

10 The expert technical assistance of J. Beaubien is gratefully acknowledged. We also thank L. Laroche for assistance in mice infections and I. Stojiljkovic, R.M. Tsohis and G.J. Zylstra for supplying strains and reagents that were used in this study.

References

1. **Agranoff, D., I. M. Monahan, J. A. Mangan, P. D. Butcher, and S. Krishna.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the *Nramp* family. *J. Exp. Med.* **190**:717-724.
2. **Bartsevich, V. V. and H. B. Pakrasi.** 1995. Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese: analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *EMBO J.* **14**:1845-1853.
3. **Bearden, S. W. and R. D. Perry.** 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol. Microbiol.* **32**:403-414.
4. **Bearden, S. W., T. M. Staggs, and R. D. Perry.** 1998. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J. Bacteriol.* **180**:1135-1147.
5. **Beuzon, C. R. and D. W. Holden.** 2001. Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes. Infect.* **3**:1345-1352.
6. **Byers, B. R. and J. E. L. Arceneaux.** 1998. Microbial Iron Transport: Iron Acquisition by Pathogenic Microorganisms, pp. 37-66. *In* A. Sigel and H. Sigel (ed.), *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals* Marcel Dekker Inc, New York.
7. **Cellier, M. F., I. Bergevin, E. Boyer, and E. Richer.** 2001. Polyphyletic origins of bacterial *Nramp* transporters. *Trends Genet.* **17**:365-370.

8. **Christianson, D. W.** 1997. Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **67**:217-252.
9. **Claverys, J. P.** 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* **152**:231-243.
10. **Dennis, J. J. and G. J. Zylstra.** 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2710-2715.
11. **Domenech, P., A. S. Pym, M. Cellier, C. E. Barry, and S. T. Cole.** 2002. Inactivation of the *Mycobacterium tuberculosis* *Nramp* orthologue (*mntH*) does not affect virulence in a mouse model of tuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**:81-86.
12. **Govoni, G., F. Canonne-Hergaux, C. G. Pfeifer, S. L. Marcus, S. D. Mills, D. J. Hackam, S. Grinstein, D. Malo, B. B. Finlay, and P. Gros.** 1999. Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect. Immun.* **67**:2225-2232.
13. **Gruenheid, S., E. Pinner, M. Desjardins, and P. Gros.** 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J. Exp. Med.* **185**:717-730.
14. **Hacker, J. and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641-679.
15. **Hantke, K.** 1997. Ferrous iron uptake by a magnesium transport system is toxic for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **179**:6201-6204.

16. **Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein, and P. Gros.** 2000. Natural resistance to intracellular infections: natural resistance- associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane. *J. Exp. Med.* **192**:1237-1248.
17. **Jakubovics, N. S. and H. F. Jenkinson.** 2001. Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* **147**:1709-1718.
18. **Janakiraman, A. and J. M. Slauch.** 2000. The putative iron transport system *SitABCD* encoded on *SP11* is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **35**:1146-1155.
19. **Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:6212-6219.
20. **Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay, and M. E. Maguire.** 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* **36**:1085-1100.
21. **Leung, K. Y. and B. B. Finlay.** 1991. Intracellular replication is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:11470-11474.
22. **Link, A. J., D. Phillips, and G. M. Church.** 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**:6228-6237.

23. **Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 *Nramp* orthologue (*MntH*) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* **35**:1065-1078.
24. **Malo, D., K. Vogan, S. Vidal, J. Hu, M. Cellier, E. Schurr, A. Fuks, N. Bumstead, K. Morgan, and P. Gros.** 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**:51-61.
25. **Mastroeni, P., A. Vazquez-Torres, F. C. Fang, Y. Xu, S. Khan, C. E. Hormaeche, and G. Dougan.** 2000. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. II. Effects on microbial proliferation and host survival in vivo. *J. Exp. Med.* **192**:237-248.
26. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics *In* A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria Cold Spring Harbor Laboratory Press.
27. **Moeck, G. S. and J. W. Coulton.** 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**:675-681.
28. **Ohl, M. E. and S. I. Miller.** 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Med.* **52**:259-274.
29. **Patzer, S. I. and K. Hantke.** 2001. Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-*MntR* of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:4806-4813.

30. **Posey, J. E. and F. C. Gherardini.** 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**:1651-1653.
31. **Que, Q. and J. D. Helmann.** 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* **35**:1454-1468.
32. **Ratledge, C. and L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:881-941.
33. **Robson, H. G. and S. I. Vas.** 1972. Resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium*. *J. Infect. Dis.* **126**:378-386.
34. **Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron, and I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect. Immun.* **64**:4549-4556.
35. **Velayudhan, J., N. J. Hughes, A. A. McColm, J. Bagshaw, C. L. Clayton, S. C. Andrews, and D. J. Kelly.** 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* **37**:274-286.
36. **Vidal, S., M. L. Tremblay, G. Govoni, S. Gauthier, G. Sebastiani, D. Malo, E. Skamene, M. Olivier, S. Jothy, and P. Gros.** 1995. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J. Exp. Med.* **182**:655-666.

37. **Zhou, D., W. D. Hardt, and J. E. Galan.** 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect. Immun.* **67**:1974-1981.

Figure legends

Figure 1 A & B: Growth in minimal medium limited in iron and manganese. The OD₆₀₀ reached after 17 h of culture at 37°C and 220 rpm in presence of various amounts of iron (A) or manganese (B) are indicated (initial OD₆₀₀ 0.05). **C & D:** Divalent metal ion uptake performed by a quick-filtration assay using a liquid scintillation counter. Bacteria were incubated in uptake medium for 6 min after addition of metals, including the radio-tracers ⁵⁴Mn (C) or ⁵⁵Fe (D). The mean (+/- standard error of the mean (SEM)) of three (A & B), and two (C & D) independent experiments is presented. Active transport is indicated by the difference in metal uptake measured at 4°C and at 37°C. W, wild-type *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, M, *mntH*, S, *sitABCD*, F, *feoB*, MS, *mntH sitABCD*, MF, *mntH feoB*, SF, *sitABCD feoB*, MSF, *mntH sitABCD feoB*. Pairwise Student's T test were performed to determine whether differences observed between each mutant and the wild-type is significant. * indicates $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$.

Figure 2 A & B: Mortality after intra-venous infection with 10³ bacteria of 129/Sv and 129/Sv *Nramp1*^{-/-} mice, with ten animals per group for each serovar Typhimurium strain. Data are presented as the proportion (%) of animals surviving the infection. Panel A (single mutants) and panel B (multiple mutants) are presented separately for the sake of clarity. Dotted lines in panel B are located under the solid lines indicating 100 % animal survival. W, wild-type, and mutants M, S, F, MS, MF, SF, MSF same as in Fig. 1. T, serovar Typhimurium *tonB*, MT, *mntH tonB*.

Figure 3: Intracellular survival and replication of *Salmonella* strains in macrophage-like cells determined by CFU plating. Cells were grown for 17 h in DMEM medium containing 100 U/mL IFN- γ prior to infection at a ratio of 1 bacteria/100 *Nramp1*^{-/-} cells and of 1 bacteria/10 *Nramp1*^{+/+} cells. (A) RAW

264.7,(B) RAW 264.7 *Nramp1*^{+/}, (C) RAW 264.7 in presence of 65 μ M DP. The mean (+/- SEM) of four (A), three (B), three (C) independent experiments is presented. *Salmonella* strains same as in Fig. 1.

Figure 4: Functional complementation of the serovar Typhimurium *mntH sitABCD* (MS) phenotype *in vitro* by over-expression of the full-length *mntH* gene. (A & B) Divalent metal ion uptake (as in Fig. 1 C & D), (C) Sensitivity to DP measured by the OD₆₀₀ reached after 6 h of sub-culture at 37°C, 220 rpm in LB medium containing 200 μ M DP, (D) Sensitivity to H₂O₂ measured by disk-assay, as described in the experimental section. The mean (+/- SEM) of two (A & B), or at least five (C), or at least six (D) independent experiments is presented. *Salmonella* strains same as in Fig. 1. pSKmntH, pBluescript plasmid with *mntH* gene, and pSKmntH Δ , plasmid with a non functional, truncated *mntH* orf.

Table 1

Bacterium, phage or plasmid	Genotype or relevant characteristics	Derivation	Source or reference
<i>S. ssp. typhimurium</i>			
W	Clinical isolate <i>S. ssp. typhimurium</i> keller		(29)
M	W <i>mntH</i> (Cm ^r)	W (pTn <i>mntH</i>)	This work
S	W <i>sitAD</i> (Sm ^r)	W (pKO <i>sitADSm</i>)	This work
F	W <i>feoB</i> (Tet ^r)	W (pEP185.2- <i>feoB</i> ::tet)	This work
T	W <i>tonB</i> (Km ^r)	P22 (AIR36) x W	This work
MS	S <i>mntH</i> (Sm ^r and Cm ^r)	P22 (M) x S	This work
MF	F <i>mntH</i> (Tet ^r and Cm ^r)	P22 (M) x F	This work
SF	F <i>sitAD</i> (Tet ^r and Sm ^r)	F (pKO <i>sitADSm</i>)	This work
MT	T <i>mntH</i> (Km ^r and Cm ^r)	T (pTn <i>mntH</i>)	This work
MSF	SF <i>mntH</i> (Sm ^r , Tet ^r and Cm ^r)	P22 (M) x SF	This work
AIR36	IR715 <i>tonB</i> (Km ^r)		(30)
<i>E. coli</i>			
S17λpir	λphage lysogen which contain π gene and allows replication of plasmids with an R6K origin		
Phages and plasmids			
P22	P22HTint		(30)
pTnMod-RCm	Plasposon with an RP4 origin for conjugation, Cm ^r		(8)
pTn <i>mntH</i>	pTnModCm derivative without Tn5 transposase gene carrying an internal PCR fragment of <i>mntH</i> ORF (Cm ^r)		This work
pKO3	pSC101 derivative who contains a temperature-sensitive origin of replication		(19)
pKO <i>sitADSm</i>	pKO3 derivative carrying the <i>sitAD</i> deletion construct composed of the 5' and 3' ends of the operon ligated to SmR K7, in replacement of the central part of the operon, Cm ^r and Sm ^r		This work
pEP185.2- <i>feoB</i> ::tet	pEP185.2 with a cassette conferring tetracycline resistance inserted in an internal site of a 895 bp fragment of <i>feoB</i> gene, tet ^r		(30)
pSK <i>mntH</i>	pBluescript SK+ carrying the complete <i>mntH</i> ORF, Amp ^r		This work
pSK <i>mntHΔ</i>	pSK <i>mntH</i> derivative in which the <i>mntH</i> ORF contains an internal deletion between two of the SacII sites, Amp ^r		This work

Figure 1

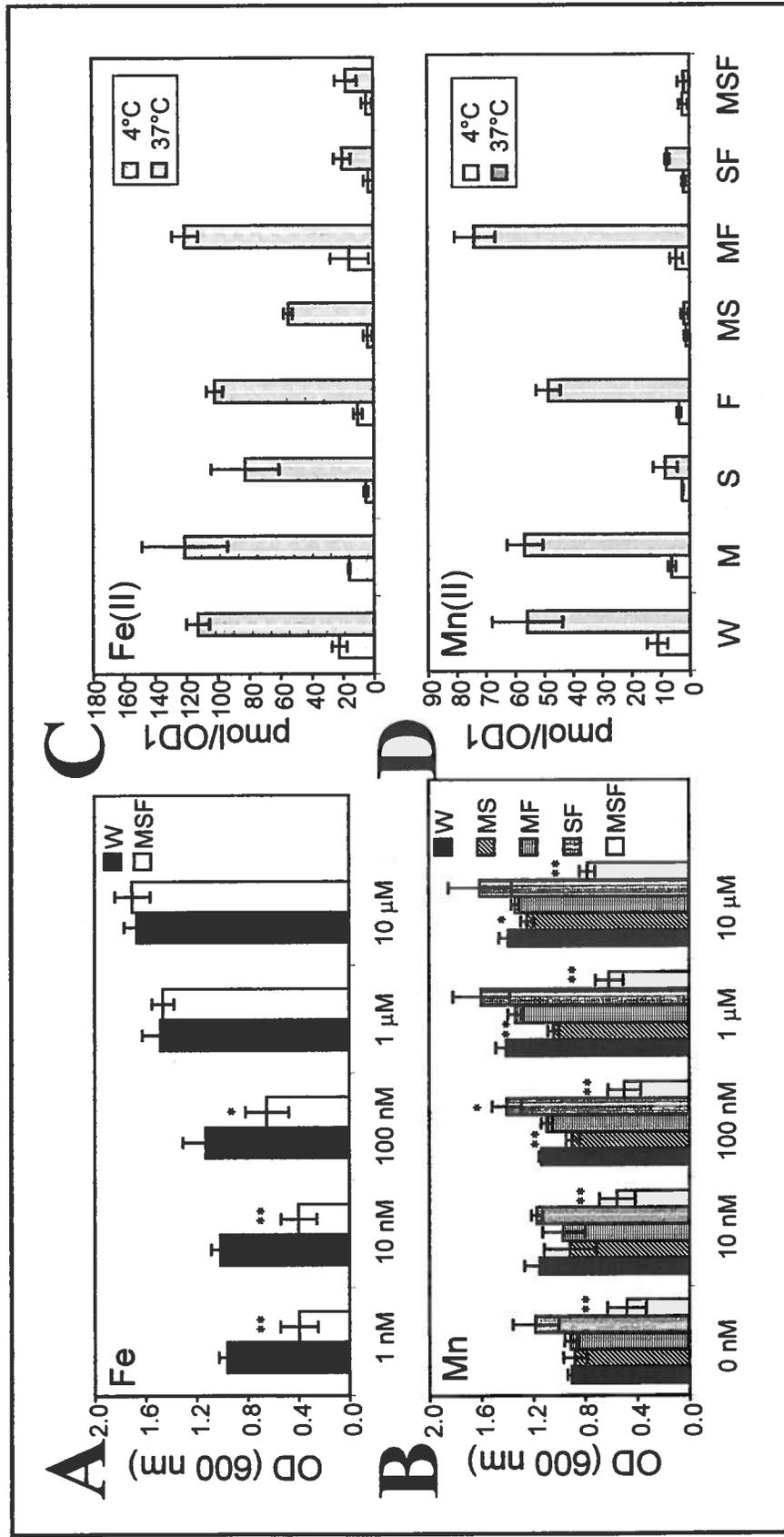


Figure 2

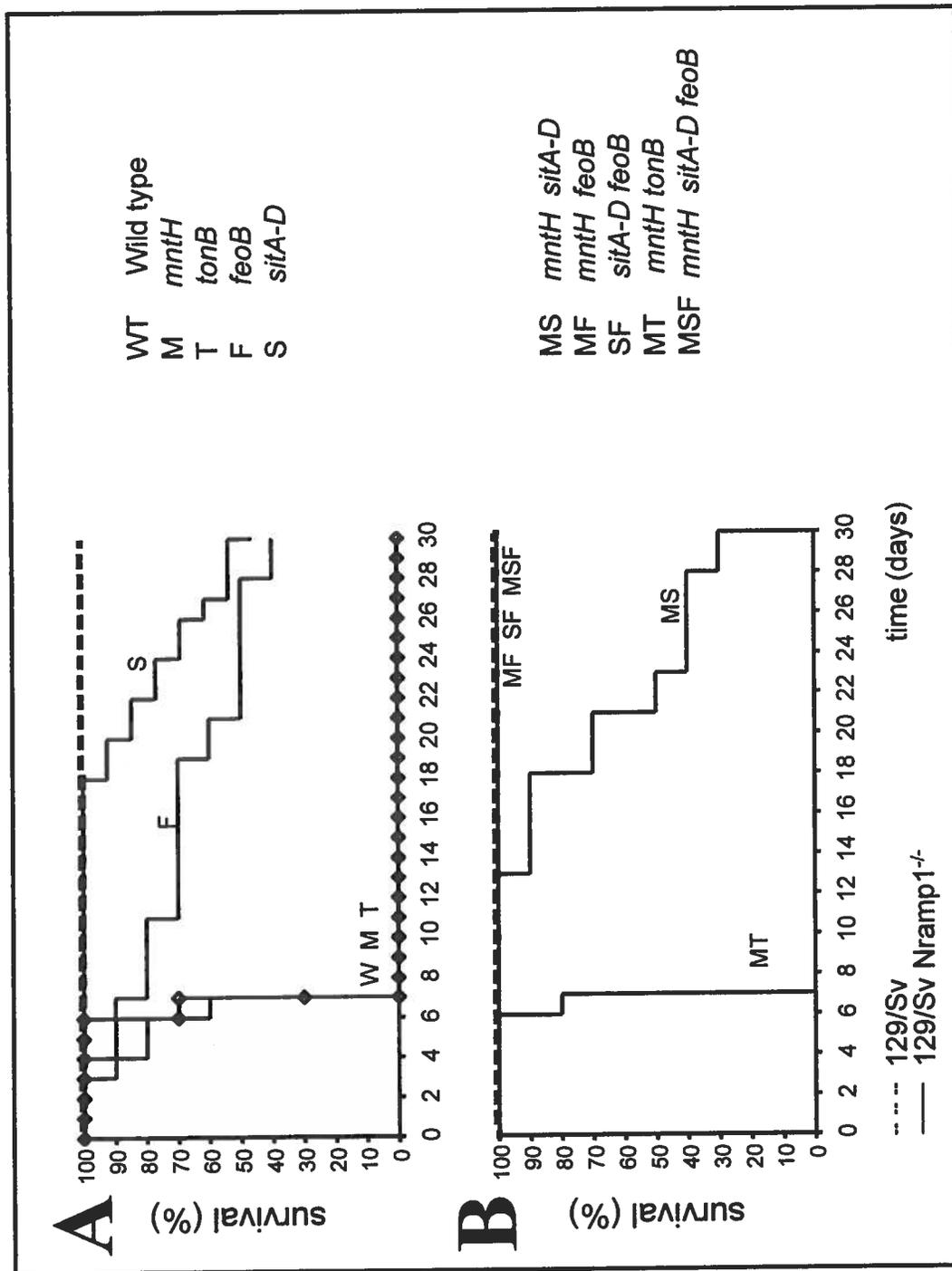
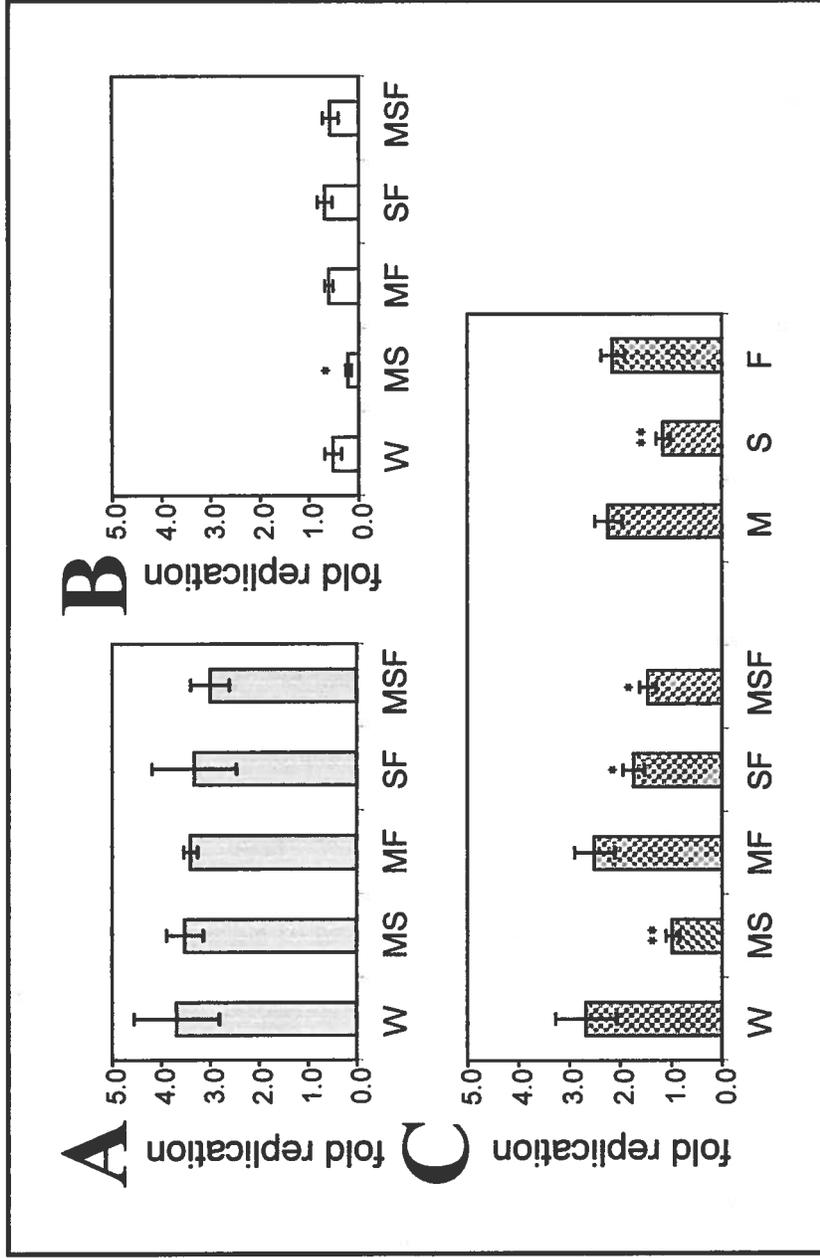


Figure3



AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
Journals Department

1752 N STREET, N.W.
WASHINGTON, DC 20036-2904
TEL: (202) 737-3600
FAX: (202) 942-9355

Dr. M. F. M. Cellier
Department of Human Health
INRS-Institut Armand-Frappier
531, boul des Prairies
Laval, (Quebec) H7V 1B7
CANADA

30 October 2001
Received: 10/29/01
Article: IAI 1479-01

Title: Acquisition of Mn(II) in Addition to Fe(II) Is Required for Full Virulence of *Salmonella typhimurium*

The above manuscript has been received. It is being referred to Dr. Stefan H. Kaufmann, Dept. of Immunology, Max Planck Inst. for Infect. Biol., Schumannstrasse 21/22, D-10117 Berlin, GERMANY (phone 49-30 28 460 500, fax 49-30 28 460 501), who will notify you as to its acceptability or suggestions for improvement. In any communications relating to this paper, please refer to the article number shown above.

In submitting this manuscript to *Infection and Immunity*, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If "in press" references cited in the submitted manuscript are important for it to be judged, send three copies of each to Dr. Kaufmann immediately. Failure to do so may delay the review.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance.

If the manuscript is accepted for publication in a 2002 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$45 per page for the first six pages and \$56 for each page in excess of six for a corresponding author who is an ASM member or \$52 per page for the first six pages and \$64 for each page in excess of six for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his 2002 member number on the reprint/page charge form that will be included with the proofs. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the enclosed ASM membership application and submit it and payment of the membership fee to ASM. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. This request must indicate how the work was financed and should be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper.

If your manuscript is accepted for publication, you will be required to provide a current e-mail address in the correspondent footnote since proofs will be handled electronically.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Diane E. Smith
Production Editor
Infection and Immunity

Enclosure

cc: All authors



Université du Québec
Institut national de la recherche scientifique

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPIER - Santé humaine

<input type="checkbox"/> 531, boulevard des Prairies Laval (Québec) H7V 1B7 CANADA Téléphone : (450) 687-5010 Télécopieur : (450) 686-5301 (anglais) (450) 686-5301 (français) www.inrs-iaf.quebec.ca	<input type="checkbox"/> 245, boulevard Hymus Pointe-Claire (Québec) H9R 1G8 CANADA Téléphone : (514) 630-8310 Télécopieur : (514) 630-8310 (français) (514) 630-8310 (anglais)
---	--

12 November 2001

Mrs Linda Illig
Director of Journals
American Society for Microbiology
1752 N Street, N.W.
Washington, D.C. 20036-2804

RECEIVED
NOV 12 2001
JOURNALS DEPARTMENT

RECEIVED
NOV 15 2001
JOURNALS DEPARTMENT

Dear Mrs Illig,

We sent last week a manuscript, that is currently submitted to Dr SHE Kaufmann (article IAI 1479-01). I would like to determine whether you would be able to grant me permission to reproduce in my M.Sc. thesis this manuscript, subject to the full acknowledgements of source, in case it is accepted.

Thanks in advance

Sincerely

Elise Boyer

Elise Boyer
from M Cellier laboratory

yes, we should be able to grant such permission if we publish the manuscript.

[Signature]
11-15-01

Mathieu F. M. Cellier, Ph. D
INRS-Institut Armand-Frappier
Centre de Recherche en Santé Humaine
531, Bd des prairies
Laval, Quebec, CANADA H7V 1B7
e-mail: mathieu.cellier@inrs-iaf.quebec.ca
Tel: (450) 687-5010 ext. 4681
Fax: (450) 686-5301



Université du Québec

Institut national de la recherche scientifique

INRS-**INSTITUT ARMAND-FRAPPIER** – Santé humaine

531, boulevard des Prairies
Laval (Québec) H7V 1B7
CANADA

Téléphone : (450) 687-5010
Télécopieur : (450) 686-5626 (direction)
(450) 686-5501 (général)
www.inrs-iaf.quebec.ca

245, boulevard Hymus
Pointe-Claire (Québec) H9R 1G5
CANADA

Téléphone : (514) 630-8800
Télécopieur : (514) 630-8940 (direction)
(514) 630-8850 (général)

Laval, le 6 Décembre 2001

OBJET : Justification de la présentation de mémoire par article de Mme E. Boyer.

A qui de droit :

Mme Elise Boyer s'est mérité la place de premier auteur sur le manuscrit présenté car elle a personnellement réalisé les travaux présentés en Fig. 1A & B, Fig. 3, et Fig. 4 C-E.

Les autres auteurs ont respectivement contribué au travail présenté dans l'article :

second auteur Fig. 1 & 4

troisième auteur Fig. 2

quatrième auteur Fig. 2

dernier auteur : Fig. 1 C & D, Fig. 4 A & B; directeur et coordinateur des travaux

Tous les auteurs ont participé à la préparation du manuscrit.

Mathieu Cellier, Ph. D

Directeur des travaux
INRS-Institut Armand-Frappier

