

**Université du Québec**  
Institut National de Recherche Scientifique - Institut Armand-Frappier

**Étude des Transporteurs de Manganèse  
Bactériens de la Famille Nramp.**  
(Transporteurs de Manganèse Dépendant du Proton :  
MntH)

Par  
Frédéric Veyrier

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès science (M.Sc) en Immunologie-Virologie

Jury d'évaluation

Président du jury

et examinateur interne

Examineur externe

Directeur de recherche

Francois Shareck, INRS Institut Armand-Frappier

Carole Beaulieu

Département de Biologie


Université de Sherbrooke

Mathieu Cellier, INRS Institut Armand-Frappier


Droits réservés de Frédéric Veyrier, 2005

## RÉSUMÉ

La superfamille Nramp, qui comprend les protéines bactériennes MntH, décrit une famille de transporteurs de métaux divalents que l'on retrouve dans de nombreuses espèces. Chez les mammifères, Nramp1 a une affinité plus forte pour le manganèse et le fer et joue un rôle important dans la protection contre les agents pathogènes intracellulaires du macrophage. Chez les bactéries, l'analyse des séquences des transporteurs MntH a permis de différencier plusieurs groupes et de décrire des exemples de transferts horizontaux de gènes *mntH* de groupe C. De la même façon, ce mémoire présente des indications du transfert horizontal, chez *Serratia marcescens*, d'un groupe de gènes comprenant, entre autres, *mntHA'* et *mntR*. Pour être acceptés par la bactérie, les gènes transférés horizontalement doivent représenter un avantage dans des conditions données. Dans le but de comprendre pourquoi les gènes *mntH* A' et C sont transférés horizontalement, nous avons exprimé des protéines MntH de différents groupes phylogénétiques dans *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* Typhimurium, afin de caractériser leur activité de transport de métaux et de protons. Les gènes actifs dans *E. coli* ont été utilisés pour générer des plasmides qui permettront de construire plusieurs souches de *S. Typhimurium* *sitAD* portant un gène *mntH* provenant des différents groupes phylogénétiques (MntH A, A', C $\alpha$  et C $\beta$ ). À plus long terme, ces souches permettront d'observer l'importance des phylotypes MntH lors de l'infection par Salmonelle *in vivo*. Nous avons aussi construit des mutants *Xanthomonas campestris*, pour évaluer le rôle endogène d'une protéine MntH de groupe C $\alpha$  (XcamC $\alpha$ ). Il a été observé que XcamC $\alpha$ , dont l'expression serait sous contrôle du répresseur MntR, transporte le cadmium et le cuivre. Il a également été observé que XcamC $\alpha$  pourrait permettre une sortie de manganèse lorsque les concentrations intracellulaires sont élevées. De plus, nous avons pu confirmer que MntH joue un rôle dans la protection contre les peroxydes, probablement en facilitant l'entrée de manganèse, et que cette fonction est conservée chez *E. coli*, *S. Typhimurium* et *X. campestris*.



Étudiant



Directeur de recherche

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier le Docteur Mathieu Cellier, mon directeur de recherche, pour m'avoir guidé tout au long de ma maîtrise, et en particulier pour son exigence qui m'a poussé à me dépasser et à être plus rigoureux. Je désire remercier l'INRS-Institut Armand-Frappier ainsi que mon directeur de recherche, pour leur soutien financier.

Un énorme merci à toutes les personnes qui m'ont permis d'apprécier les moments passés à l'institut. Je tiens particulièrement à remercier toutes les personnes du laboratoire, Carole, Evelyn, Etienne, Laetitia, Louise, Pascal et Roman, pour leur participation à cette étude, leur aide et leurs nombreux conseils judicieux mais aussi pour les nombreux moments agréables, quelques fois colorés.

Je tiens aussi à remercier nos voisins, en particulier Ingrid, les directeurs de programme pour leurs nombreux conseils. Je remercie aussi l'équipe du musée Armand-Frappier, car cette rencontre m'a tellement apporté.

J'aimerais remercier mes amis d'ici ou d'ailleurs, en particulier Mathieu, Aurélie et Isabelle, pour m'avoir écouté et soutenu dans les moments difficiles mais aussi pour nos nombreux moments agréables.

Enfin, je remercie ma famille sans qui je ne serais rien, en particulier mes parents Ginette et Lucien, mon frère Stéphane et ma sœur Nathalie et ma petite filleule Mélissa. Votre aide, vos encouragements, vos conseils et votre affection sont inestimables à mes yeux.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>II</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVUE DE LITTÉRATURE</b> .....	<b>5</b>
2.1 Importance des métaux et du manganèse dans la physiologie bactérienne .....	6
2.1.1 Propriétés du manganèse .....	6
2.1.2 Rôle du manganèse dans la détoxification des composés oxygénés .....	7
2.1.2.1 Utilisation du manganèse pour protéger contre les anions superoxydes .	9
2.1.2.2 Utilisation du manganèse pour protéger contre les peroxydes .....	9
2.2 Les régulateurs bactériens dépendants du manganèse et du fer .....	13
2.2.1 La famille des métallo-régulateurs Fur .....	13
2.2.1.1 Le régulateur Fur (Ferric Uptake Regulator) .....	13
2.2.1.2 Le régulateur PerR (Peroxide regulator) .....	14
2.2.1.3 Le régulateur Zur .....	15
2.2.2 La famille des métallo-régulateurs DtxR .....	15
2.2.2.1 Fer ou manganèse : Choix adapté à la physiologie des bactéries .....	15
2.2.2.2 MntR .....	17
2.2.3 Les systèmes à deux composantes (ManR-ManS) .....	18
2.3 Les transporteurs de manganèse .....	19
2.3.1 La superfamille Nramp .....	19
2.3.1.1 Transferts Horizontaux de Gènes (THG) .....	19
2.3.1.2 Historique de la famille Nramp .....	20

2.3.1.3	Schéma évolutif de la superfamille Nramp.....	25
2.3.1.4	Transport de métal par MntH et régulation de <i>mntH</i> .....	27
2.3.2	Transporteurs de la superfamille de type ABC.....	29
2.3.3	Transporteurs de la famille P-Type ATPase et autres transporteurs.....	30
2.4	Importance des métaux dans la relation hôte-pathogène : Hypothèse de compétition .....	33
2.5	Importance des transporteurs de manganèse dans l'infection par <i>S. Typhimurium</i> .....	35
2.6	<i>Xanthomonas campestris</i> .....	37
<b>3.</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>40</b>
3.1	Souches bactériennes et milieux de culture utilisés.....	41
3.2	Protocoles généraux concernant la manipulation d'ADN.....	44
3.2.1	Extraction de plasmides .....	44
3.2.2	Réactions de biologie moléculaire à l'aide d'enzymes.....	44
3.2.3	Électrophorèse des fragments d'ADN .....	46
3.2.4	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....	46
3.2.5	Purification des fragments d'ADN .....	50
3.2.6	Extraction d'ADN génomique .....	50
3.2.7	Préparation des sondes par marquage radioactif à l'aide du <sup>32</sup> P .....	52
3.2.8	Buvarpage de type Southern .....	53
3.2.9	Préparation de bactéries compétentes et transformation.....	54
3.3	Construction des plasmides pBAD ::MntH .....	55
3.4	Mutagenèse dirigée des protéines EcolA, CtepB, et XcamCa.....	56
3.5	Marquage métabolique des homologues MntH à l'aide de [ <sup>35</sup> S]-Méthionine ...	57
3.6	Construction du plasmide pGBM6-pH et mesure du transport de protons dépendant des homologues .....	60
3.7	Construction d'un mutant <i>S. Typhimurium mntH ::Km, sitA ::Sm</i> (M2S).....	60
3.8	Construction des plasmides pKO35' <i>mntH3'</i> .....	63
3.9	Tests de sensibilité aux métaux et aux oxydants des souches <i>E. coli</i> et <i>S. Typhimurium</i> .....	64
3.10	Construction des plasmides pour la fabrication des mutants <i>X. campestris</i> .....	68

3.11	Construction du plasmide de complémentation pCRH ( <i>cumB-mntR-mntH</i> ).....	70
3.12	Conjugaison et échange d'allèles dans <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> .....	70
3.13	Protocole des tests phénotypiques des mutants <i>X. campestris</i> .....	71
3.14	Outils de statistique et de bioinformatique. ....	73
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>74</b>
4.1	Expression, à l'aide du plasmide pBAD, des homologues dans <i>E. coli</i> DH11S <i>mntH</i> .....	75
4.1.1	Choix des protéines MntH .....	75
4.1.2	Recherche d'homologues MntH actifs.....	76
4.1.3	Expression des homologues.....	81
4.1.4	Transport de protons par les homologues exprimés dans le système pBAD. .....	84
4.1.5	Impacts de mutations identiques sur l'histidine de trois représentants des groupes A, B et C.....	867
4.2	Phénotype du mutant <i>S. Typhimurium mntH, sitA-D</i> (M2S).....	89
4.2.1	Vérification du mutant <i>S. Typhimurium mntH ::KmR, sitA-D :: SmR</i> .....	89
4.2.2	Sensibilité des mutants <i>S. Typhimurium mntH, sitA</i> , et <i>mntH-sitAD</i> aux t- BOOH et à la ménadione .....	90
4.2.3	Effets du manganèse et du fer sur la sensibilité au t-BOOH et à la ménadione des mutants <i>S. Typhimurium M2S</i> .....	91
4.3	Complémentation de <i>S. Typhimurium mntH ::Km sitAD ::Sm</i> par des homologues MntH des groupes A, A', B et C .....	95
4.3.1	Complémentation par les homologues exprimés dans le système pBAD..	95
4.3.2	Complémentation de la sensibilité au t-BOOH de M2S par les homologues exprimés dans le système pK035' <i>mntH3'</i> .....	99
4.4	Sensibilité de certains mutants <i>E. coli</i> à l' $H_2O_2$ , au t-BOOH et à la ménadione ... .....	102
4.5	Indications du transfert horizontal de l'opéron supposé <i>mntR-mntHA'</i> , chez <i>Serratia marcescens</i> .....	104
4.6	Organisation des gènes <i>mntR</i> et <i>mntH</i> en opéron et prédiction de l'affinité des protéines MntR.....	110

4.7	Étude d'un gène <i>mntHCα</i> dans un contexte endogène.....	113
4.7.1	Construction de trois mutants <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> <i>mntR</i> (R), <i>mntH</i> (H) et <i>mntR-mntH</i> (RH).....	113
4.7.2	Défaut de croissance du mutant <i>X. campestris mntH-R</i> et augmentation de ce défaut par le plasmide pCRH .....	117
4.7.3	Sensibilité aux peroxydes des mutants <i>X. campestris</i> .....	118
4.7.4	Sensibilité à la ménadione des mutants <i>X. campestris</i> .....	118
4.7.5	Sensibilité aux métaux divalents ( $Mn^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Cu^{2+}$ ).....	119
5.	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>123</b>
6.	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>148</b>
7.	<b>APPENDICE A</b> .....	<b>151</b>
8.	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>154</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Réactions non-enzymatiques, dépendantes du manganèse, permettant la détoxification des anions superoxides ( $O_2^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) <i>in vitro</i> .....	8
Figure 2.	Mécanismes d'action des métallo-répresseurs Fur (A), MntR (B), et PerR (C). .....	11
Figure 3.	Représentation schématique de l'évolution de la famille Nramp/MntH.....	23
Figure 4.	Représentation schématique de l'hypothèse de compétition pour l'acquisition des métaux. ....	31
Figure 5.	Représentation schématique des différents fragments utilisés pour la construction des plasmides pK18.....	66
Figure 6.	Sensibilité aux cations divalents des souches <i>E. coli</i> DH11S <i>mntH</i> , dépendante de l'expression dans le système pBAD, d'homologues MntH (A) et des protéines EcolA, CtepB et XcamCα mutées (B).....	79
Figure 7.	Expression, dans <i>E. coli</i> DH11S <i>mntH</i> (pBAD ::MntH), des homologues (A) et des protéines EcolA et XcamCα mutées (B), mesurée par marquage métabolique à l'aide de [ $^{35}S$ ]-Méthionine.....	82
Figure 8.	Caractérisation fonctionnelle du transport de protons, en présence de cadmium, dépendant de l'expression des homologues MntH. ....	85
Figure 9.	Vérification, des mutants <i>S. Typhimurium sitA-D</i> , <i>mntH</i> ::Km, par buvardage de type Southern (A). Sensibilité, au t-BOOH (B) et à la ménadione (C), des mutants M, S, et M2S et effet du manganèse et du fer sur la sensibilité du mutant M2S (D). ....	93
Figure 10.	Effet de l'expression des homologues, dans le système pBAD, sur la sensibilité à la ménadione (A) et au t-BOOH (B) du double mutant <i>S. Typhimurium</i> M2S.....	97
Figure 11.	Complémentation du phénotype de sensibilité au t-BOOH du double mutant M2S à l'aide des homologues, exprimés sous le contrôle du promoteur natif de <i>mntH</i> de <i>S. Typhimurium</i> . ....	100



- Figure 12. Analyse de la région du génome de *S. marcescens* contenant *mntH* A'..... 108
- Figure 13. Analyse des séquences des protéines MntR de certaines  $\alpha$  et  $\gamma$ -protéobactéries et de *B. subtilis* (A) et représentation schématique des loci, identifiés à ce jour, possédant les gènes *mntR* et *mntH* (B)..... 111
- Figure 14. Vérification, par buvardage de type Southern, des délétions géniques des trois mutants *X. campestris* *mntH* (H) (A), *mntR-mntH* (RH) (B) et *mntR* (R) (C) ..... 115
- Figure 15. Phénotypes des mutants *X. campestris*. ..... 121

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Souches bactériennes utilisées .....	43
Tableau 2.	Plasmides utilisés .....	45
Tableau 3.	Oligonucléotides utilisés .....	48
Tableau 4.	Conditions expérimentales de toutes les réactions de polymérisations en chaîne. ....	49
Tableau 5.	Sensibilité à différents métaux, de souches <i>E coli</i> exprimant les homologues MntH, de groupe A, B, et C portant des mutations identiques. ....	88
Tableau 6.	Sensibilité des mutants <i>E. coli</i> au stress oxydatif. ....	103

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>Amp :</b>	Ampicilline
<b><i>avr</i> :</b>	avirulence
<b>ABC :</b>	ATP Binding cassette
<b>Cm :</b>	Chloramphénicol
<b>CPM :</b>	Coups Par Minute
<b>DO<sub>600</sub> :</b>	Densité Optique à 600 nm
<b>DP :</b>	2,2'-Dipyridyl
<b>DtxR :</b>	Diphtheria Toxin Repressor
<b>Fur :</b>	Ferric Uptake Regulator
<b>GFP :</b>	Green Fluorescent Protein
<b>Gm :</b>	Gentamycine
<b>HR :</b>	Réponse d'Hypersensibilité
<b><i>hrp</i> :</b>	hypersensitivity response and pathogenicity
<b>Km :</b>	Kanamycine
<b>MntH :</b>	Proton-Dependant Manganese Transporter
<b>MntR :</b>	Manganese Transport regulator
<b>NO :</b>	composés réactifs du nitrogène
<b>NOS :</b>	Oxyde Nitrique Synthétase
<b>Nramp :</b>	Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
<b>MS ou M2S :</b>	<i>S. Typhimurium mntH, sitA-D</i>
<b>pb :</b>	Paire de Base
<b>PCR :</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PerR :</b>	Peroxide regulator
<b>ROS :</b>	composés réactifs de l'oxygène
<b>RPM :</b>	Rotation Par Minute
<b>Sm :</b>	Streptomycine
<b>Sod :</b>	Superoxyde Dismutase
<b>t-BOOH :</b>	Tert-Butyl Hydroperoxyde
<b>Tet :</b>	Tétracycline
<b>THG :</b>	Transferts Horizontaux de Gènes
<b>Ts :</b>	Thermosensible

# **1. INTRODUCTION**

Lors d'une infection, l'hôte diminue l'accès aux métaux aux agents pathogènes présents. La protéine Nramp1, chez les mammifères, en est un exemple. Elle aurait comme fonction de diminuer l'accès des métaux, aux bactéries présentes dans le phagosome. La protéine Nramp1, fait partie de la superfamille Nramp (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein) qui décrit un ensemble de protéines impliquées dans le transport de cations divalents ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ...). On retrouve des membres de cette famille aussi bien chez les mammifères, les plantes, les eucaryotes primaires, mais aussi les procaryotes, où elle a été renommée MntH (Proton-Dependant Manganese Transporter).

Grâce au séquençage de différents génomes, il est très aisé de connaître les séquences protéiques et d'analyser les différences entre les espèces. Les analyses phylogéniques des protéines MntH ont permis de séparer celles-ci en trois groupes (A, B, et C), le groupe A étant subdivisé en 2 sous-groupes (A et A') et le groupe C en trois sous-groupes (C $\alpha$ , C $\beta$ , et C $\gamma$ ). Les protéines du groupe B, sont retrouvées principalement dans des espèces bactériennes vivant en anaérobiose, ce qui suggère que les protéines de ce groupe auraient évolué en absence d'oxygène, et donc de stress oxydatif. Contrairement au groupe A, les phylogénies du groupe C et A' ne correspondent pas à la phylogénie basée sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S. De plus, certaines indications de transferts horizontaux, de protéines du groupe C, ont été décrites. Une seule espèce, à ce jour, *Serratia marcescens*, contient dans son génome deux gènes qui codent pour une protéine du groupe A et une du groupe A'. Cet élément supporte la proposition de transferts horizontaux de gènes de groupe A' et C.

Les protéines MntH, de *E. coli*, *S. Typhimurium* et *M. tuberculosis*, sont principalement des transporteurs de manganèse, mais il semble qu'elles soient aussi capables de transporter le fer et d'autres métaux divalents. Or, le manganèse est un métal dont le rôle, dans la physiologie des bactéries, est relativement peu connu et très peu de fonctions lui ont été attribuées en comparaison avec le fer. De plus, son rôle est souvent difficile à évaluer car les concentrations nécessaires à la survie de la plupart des bactéries sont faibles. Cependant, notre perception du rôle probable du manganèse est en train de

changer profondément. En effet, une variété d'enzymes bactériennes utilise le manganèse comme cofacteur ou comme co-catalyseur. De plus, plusieurs espèces que l'on sait très adaptées à des conditions extrêmes comme la dessiccation ou les radiations ionisantes, accumulent et sont dépendantes du manganèse. Enfin, le manganèse a été récemment décrit, dans certaines bactéries, comme régulateur de différentes protéines notamment d'enzymes très importantes pour la survie et impliquées dans la protection contre le stress oxydatif. Or, il existe d'autres familles de transporteurs, autre que MntH, qui permettent l'entrée de manganèse dans la bactérie, on peut citer notamment SitABCD, que l'on retrouve souvent chez des bactéries pathogènes comme *Salmonella Typhimurium*.

Le but principal de la recherche présentée dans ce mémoire est de tester l'hypothèse, formulée grâce aux analyses de séquences des protéines MntH, que les protéines du groupe C et A', transférées horizontalement, confèrent un avantage en comparaison avec celles du groupe A. Ceci peut être fait, en décrivant le rôle possible de MntH dans l'accumulation des métaux et en testant certaines situations où la protéine MntH et indirectement les métaux, jouent un rôle important, notamment dans la résistance au stress oxydatif ou dans le processus de pathogenèse et de survie intracellulaire.

La première étape, pour essayer de répondre à cette question, requiert l'amplification de différents homologues bactériens principalement du groupe C et A, pour les cloner dans un plasmide, sous contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose (pBAD24), et de les exprimer dans *Escherichia coli* afin de mesurer leur expression, leur dégradation et le transport des métaux et des protons.

Le mutant MS (*mntH, sitABCD*) chez *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolat Keller, a été décrit précédemment (comparativement au simple mutant M et S) comme étant atténué lors d'infection de souris susceptibles, comme présentant un défaut de captage du manganèse et du fer et une croissance plus lente en présence de chélateurs. Enfin, celui-ci présente une sensibilité accrue au peroxyde d'hydrogène. La seconde étape sera donc, d'essayer de compléter ces phénotypes, en exprimant les protéines MntH de différents groupes, soit sous le contrôle du promoteur de pBAD, soit sous le contrôle du promoteur du gène *mntH* de *S. Typhimurium*.

La dernière étape est la caractérisation d'une protéine MntH de groupe C $\alpha$  dans la bactérie d'origine. La méthode fait intervenir la construction de trois mutants *mntH*, *mntH-mntR*, et *mntR*, chez *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, un agent phytopathogène. Le but final de ces constructions est d'étudier le rôle de la protéine MntH de groupe C et de son régulateur supposé MntR, dans la pathogenèse chez la plante où les métaux jouent un rôle important et de caractériser certains phénotypes, dans un but final de complémentation avec d'autres homologues MntH.

La première partie de ce mémoire présente une revue de littérature pertinente au sujet de recherche, notamment le rôle du manganèse dans la physiologie bactérienne et dans la régulation des gènes, une description des transporteurs bactériens de manganèse connus, en particulier ceux de la famille Nramp, le rôle des métaux dans la relation hôte-pathogène et enfin la présentation des modèles d'études. Cette section est suivie d'un résumé des techniques utilisées, d'une description des résultats les plus importants obtenus et la dernière partie présente une discussion des résultats obtenus.

## **2. REVUE DE LITTÉRATURE**



## 2.1 Importance des métaux et du manganèse dans la physiologie bactérienne

### 2.1.1 Propriétés du manganèse

La plupart des métaux divalents sont des éléments essentiels à la vie et notamment à celle des bactéries. Cependant, une concentration trop forte peut être toxique c'est pourquoi, leur transport, leur stockage et leur sécrétion sont des phénomènes extrêmement importants et régulés de façon très précise. Le fer est clairement le métal le plus étudié. Malgré tout, depuis quelques années, le manganèse commence à être plus étudié et son importance dans la physiologie bactérienne a été établie. Le manganèse est moins toxique que le fer et de petites quantités (1 nM) suffisent à la croissance de la plupart des bactéries. C'est pourquoi, il était considéré comme un nutriment secondaire (Archibald 1986). Mais certaines bactéries ont substitué le fer au manganèse et donc requièrent de grandes quantités pour croître. C'est le cas notamment des bactéries du genre *Lactobacillus* qui ont besoin d'environ 35 mM de manganèse pour une croissance normale (Archibald 1986; Imbert et Blondeau 1998) ou *Borrelia burgdorferi*, agent de la maladie de Lyme, dont la croissance est affectée par l'absence de manganèse, contrairement à celle de fer (Posey et Gherardini 2000). D'autres microorganismes du genre *Deinococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, et *Cyanobacteria spp.* ont un ratio [Mn]/[Fe] en faveur du manganèse et, sont aussi des espèces très résistantes à la dessiccation et aux radiations  $\gamma$  (Daly, Gaidamakova et al. 2004). Ainsi, il a été montré, chez *Deinococcus radiodurans*, une corrélation entre la résistance aux rayons  $\gamma$  et un ratio [Mn]/[Fe] en faveur du manganèse (Daly, Gaidamakova et al. 2004).

Comme le fer, le manganèse est impliqué, chez les bactéries, dans de nombreuses réactions physiologiques. On peut citer par exemple, la photosynthèse oxygénique chez les cyanobactéries où la protéine PSII-O (Photosystème II) est stabilisée par quatre atomes de manganèse (Morgan, Shand et al. 1998), ou bien encore la glycogénèse (Chao, Patnaik et al. 1993; Mukhopadhyay, Stoddard et al. 1998), la glycolyse (Chander, Setlow et al. 1998), le métabolisme des acides aminés (Abell, Schineller et al. 1995; Chen, Dekker et al. 1995), la dégradation des acides nucléiques (Hosfield, Guan et al. 1999; Ohtani, Haruki et al. 1999) ou encore l'enzyme SpoT (ppGpp hydrolase) qui intervient

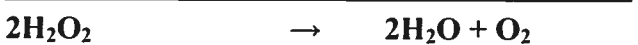
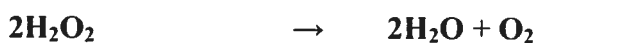
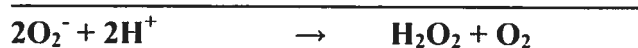
lors de la réponse à un stress dû au manque d'acides aminés (Rao, Liu et al. 1998) etc. Cependant, le rôle principal que l'on retient pour le manganèse est un rôle protecteur contre le stress oxydatif. Le manganèse est un métal très analogue au magnésium, mais qui est, de plus, redox-actif. On le retrouve principalement sous deux formes  $Mn^{2+}$  et  $Mn^{3+}$  (Cowan 1997). Ces deux formes donnent au manganèse la propriété d'interagir avec d'autres molécules dans des réactions d'oxydoréduction (échange d'électrons). Le fer et le cuivre possèdent, eux aussi, un potentiel d'oxydoréduction très important.

### **2.1.2 Rôle du manganèse dans la détoxification des composés oxygénés**

Les anions superoxydes, tout comme les autres composés oxygénés, sont des molécules hautement réactives. Ces composés sont produits lors de la respiration aérobie bactérienne (source endogène), mais aussi par l'hôte comme moyen de défense (source exogène). La présence de tels composés entraînera de nombreuses conséquences néfastes pour la bactérie (Simic, Bergtold et al. 1989; Janssen, van der Straaten et al. 2003). L'anion superoxyde (modèle d'étude paraquat, ménadione) réagira avec les groupements fer-soufre, entraînant le relâchement du fer dans le cytoplasme et l'inactivation de certaines enzymes (en particulier celles de la synthèse des acides aminés). Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ainsi que les peroxydes organiques (ROOH) (modèle d'étude tert-butyl hydroperoxyde, cumene hydroperoxyde), causeront de nombreux dégâts au niveau des membranes (péroxydation des lipides), des enzymes (oxydation des groupements thiols), et de l'ADN. Cependant, c'est en présence de métaux comme le fer, que ceux-ci entraîneront des conséquences plus néfastes. En effet, via la réaction de Fenton, il y aura production de radicaux hydroxyl ( $OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$ ), à demi-vie courte, mais avec une plus importante réactivité. De même, les peroxydes organiques entraîneront la formation de composés alkyl ( $R^{\cdot}$ ), et alkoxy ( $RO^{\cdot}$ ) et peroxy ( $ROO^{\cdot}$ ), hautement réactifs. Toutefois, la bactérie a développé de nombreux systèmes de protection contre ces composés dont certains utilisent le manganèse.

**Figure 1. Réactions non-enzymatiques, dépendantes du manganèse, permettant la détoxification des anions superoxydes ( $O_2^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) *in vitro***

D'après (Seib, Tseng et al. 2004) :



### 2.1.2.1 Utilisation du manganèse pour protéger contre les anions superoxydes

Le manganèse sert de cofacteur à certaines superoxyde dismutases (Sod). Ces enzymes ubiquitaires existent sous différentes formes et ont toutes une régulation et un contexte d'utilisation différent mais toutes ont, comme propriété, de catalyser la réaction suivante :



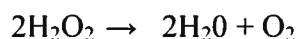
Toutes utilisent, de manière spécifique, un métal divalent comme cofacteur. Par exemple, chez les bactéries, SodA et SodM utilisent le manganèse, SodB le fer et SodC, le cuivre ou le zinc. Cependant, on ne retrouve pas forcément toutes ces enzymes dans la même bactérie. Ces enzymes protègent la bactérie contre les anions superoxydes. Par exemple, en absence de Sod, *Staphylococcus aureus* est plus sensible au methyl viologen (aussi appelé paraquat, un générateur d'anions superoxydes  $\text{O}_2^-$  intracellulaire) et cette sensibilité peut être compensée par un ajout de manganèse au milieu (Karavolos, Horsburgh et al. 2003). De plus, certaines bactéries ne possédant pas de Sod, utiliseraient directement le manganèse pour détoxifier les anions superoxydes (Archibald 1986). En effet, plusieurs propriétés de détoxification des anions superoxydes, non enzymatiques, ont été démontrées *in vitro* (Figure 1).

### 2.1.2.2 Utilisation du manganèse pour protéger contre les peroxydes

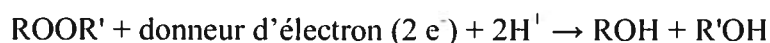
En présence de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), les métaux dont le potentiel d'oxydoréduction est suffisamment important, favoriseront l'apparition de réactions chimiques très nocives pour la bactérie, appelées réaction de Fenton:



Malgré tout, le manganèse semble avoir une réactivité de type Fenton moindre, ce qui en fait un composé moins toxique (Cellier, Bergevin *et al.* 2001; Kehres et Maguire 2003), et de plus, il sera même utilisé pour détoxifier les peroxydes. Il existe différentes enzymes qui permettent à la bactérie de se protéger contre les peroxydes par exemple, les catalases qui catalysent la réaction suivante :



les peroxydases qui catalysent la réaction suivante :



et les catalases\peroxydases qui sont capables de catalyser les deux réactions.

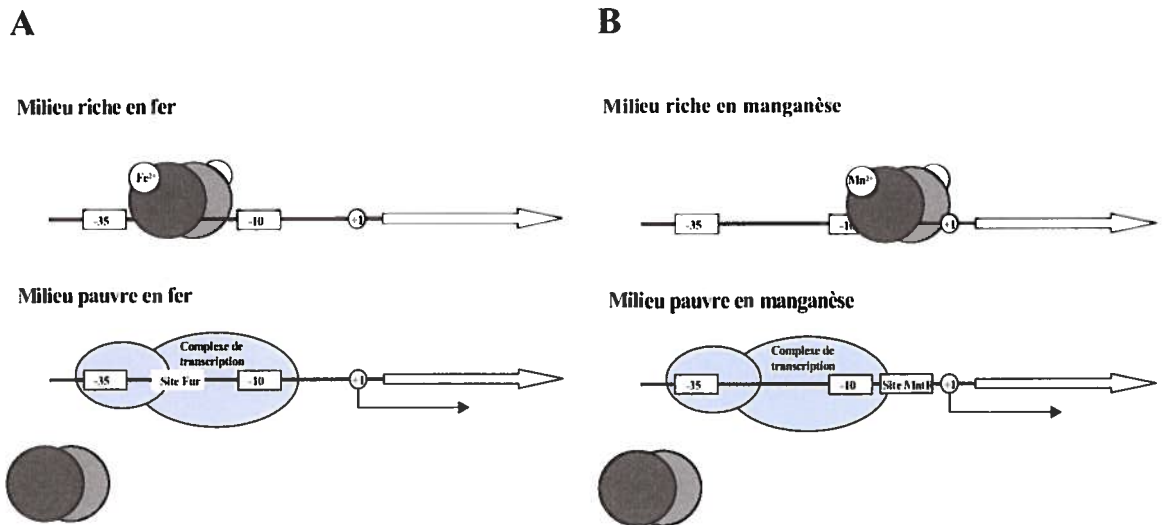
Certaines de ces enzymes utilisent le manganèse comme cofacteur, on peut citer notamment une famille dépendante du manganèse, appelée non-hème catalase ou KatN que l'on a décrit chez *Lactobacillus plantarum* (Igarashi, Kono et al. 1996), *Thermus spp.* (Kagawa, Murakoshi et al. 1999), *Pyrobaculum calidifontis* (Amo, Atomi et al. 2002), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *Salmonella enterica* Typhimurium (Robbe-Saule, Coynault et al. 2001) mais pas chez *E. coli*. On retrouve une catalase\peroxydase CpeB chez *Streptomyces reticuli*, qui montre une activité catalase et peroxydase dépendante d'un groupement hème, mais aussi une activité peroxydase indépendante d'un groupement hème, mais dépendante du manganèse (oxydation du manganèse) (Zou, Borovok et al. 1999; Ortiz de Orue Lucana, Schaa et al. 2004). De même, les protéines KatG (catalases\peroxydases NADH oxydase), provenant de *Mycobacterium tuberculosis*, *Burkholderia pseudomallei* et *E. coli*, montrent une plus forte activité en présence de manganèse (Singh, Wiseman et al. 2004). Il existe également une famille de peroxydases dépendantes du manganèse, MnP, identifiée chez certains champignons comme *Phanerochaete chrysosporium* (Mino, Wariishi et al. 1988) mais, à ce jour, aucun homologue n'a été identifié chez les bactéries.

En plus de servir de cofacteur, il a été démontré *in vitro* un rôle du manganèse dans la détoxification non enzymatique du peroxyde d'hydrogène (figure 1).

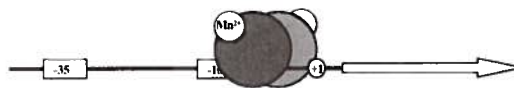
Si tout le monde s'accorde sur l'effet protecteur du manganèse contre le stress oxydatif qu'il soit de type peroxyde ou de type anion superoxyde, ce n'est pas forcément le cas pour les autres métaux divalents. En effet, certains métaux, en particulier le fer et le cuivre, sont énormément redox actifs et, en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  participent à l'apparition de réactions de type Fenton beaucoup plus nocives pour la bactérie. De même, il est aussi suggéré que le cadmium un métal très toxique qui n'a pour l'instant pas de rôle bénéfique connu va, quant à lui, participer à la création d'un stress de type peroxyde organique (Banjerdkiij, Vattanaviboon et al. 2005).

**Figure 2. Mécanismes d'action des métallo-répresseurs Fur (A), MntR (B), et PerR (C).**

A) Mécanisme d'action du répresseur Fur (forme dimérique) en présence ou non de fer. Figure adaptée de (Escolar, Perez-Martin et al. 1999; Bergevin 2003). Pour une description plus détaillée voir la section 2.2.1.1. B) Mécanisme d'action du répresseur MntR (forme dimérique) en présence ou non de manganèse. Figure adaptée de (Helmann 2004). Pour une description plus détaillée voir la section 2.2.2 C) Mécanisme d'action du répresseur PerR (forme dimérique, avec ou sans ponts disulfures) en présence ou non de fer, de manganèse, et de peroxyde d'hydrogène. Figure adaptée de (Mongkolsuk et Helmann 2002) Pour une description plus détaillée voir la section 2.2.1.2.



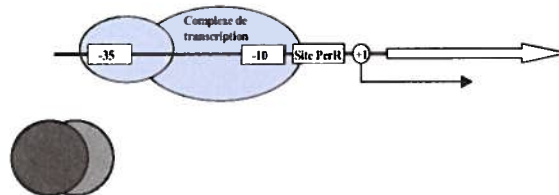
**C** Milieu riche en manganèse avec ou sans  $H_2O_2$



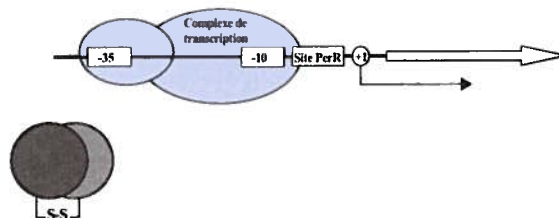
Milieu riche en fer sans  $H_2O_2$



Milieu pauvre en manganèse et en fer



Milieu riche en fer, pauvre en manganèse, avec  $H_2O_2$



## 2.2 Les régulateurs bactériens dépendants du manganèse et du fer

La régulation par le fer et celle par le manganèse sont étroitement liées. En effet, toutes les bactéries ne disposent pas des mêmes régulateurs. Certains régulateurs peuvent être strictement actifs en présence de fer dans une bactérie, et en présence de fer et de manganèse dans d'autres bactéries. Le régulateur est donc adapté à la physiologie de l'organisme. Les régulateurs les plus étudiés pour l'instant, sont les régulateurs de type Fur (Fur, PerR, Zur), et ceux de la famille DtxR.

### 2.2.1 La famille des métallos-régulateurs Fur

#### 2.2.1.1 Le régulateur Fur (Ferric Uptake Regulator)

On retrouve ce régulateur dans un grand nombre de bactéries autant Gram positif que Gram négatif. Les séquences protéiques sont relativement bien conservées, et la plupart des homologues bactériens de Fur parviennent à compléter le mutant *fur* de *E. coli* (Escolar, Perez-Martin et al. 1999). Ce régulateur est un répresseur (figure 2) : lorsque le fer est abondant dans la bactérie, celui-ci se complexe avec Fur, et le complexe peut se lier à des motifs conservés dans certains promoteurs bactériens, empêchant l'ARN polymérase de s'y lier et donc de transcrire le gène (Escolar, Perez-Martin et al. 1999). La séquence consensus qui permet la liaison du complexe Fer-Fur, est assez conservée. Elle est définie par : gATAATgATAATcATTATc (Escolar, Perez-Martin et al. 1999). Certains promoteurs contiennent des répétitions de ces séquences consensus, ce qui pourrait donner une gradation à la répression par Fur (Escolar, Perez-Martin et al. 1999).

Fur est une molécule abondante dans la cellule (Watnick, Eto et al. 1997), ceci s'explique par le fait que Fur réprime de nombreux gènes (Escolar, Perez-Martin et al. 1999). Parmi les gènes régulés par Fur, on peut citer notamment, des protéines qui interviennent dans le captage de Fer comme par exemple les sidérophores et leurs récepteurs membranaires (Ernst, Bennett et al. 1978), de nombreuses enzymes intervenant dans la réponse au stress oxydatif comme SodA (Hassan et Sun 1992), mais aussi les transporteurs de manganèse à haute affinité, SitABCD et MntH (Zhou, Hardt et al. 1999;



Boyer, Bergevin et al. 2002; Kehres, Janakiraman et al. 2002; Bergevin 2003). De plus, un phénomène de régulation positive par Fur, mais d'une façon indirecte, a été récemment décrit. En effet, l'opéron *sdhCDAB*, codant pour une succinate dehydrogenase, ainsi que *acnA* (acotinase), *fumA* (fumarate), deux gènes de ferritines *finA* et *hfr*, et *sodB* (Fe-superoxyde dismutase), sont régulés positivement par Fur au moyen d'un ARNm anti-sens RyhB lui-même réprimé par Fur (Masse et Gottesman 2002).

La régulation par Fur des transporteurs de manganèse, a été étudiée chez différentes espèces bactériennes et, il a été observé que chez certaines bactéries, Fur est aussi capable de se lier au manganèse pour effectuer sa répression. Par exemple, chez *Yersinia pestis* (pas de MntR), le transporteur de manganèse YfeABCD est réprimé par le manganèse ainsi que le fer via Fur (Runyen-Janecky, Reeves et al. 2003; Chao, Becker et al. 2004). De même, chez *Salmonella Typhimurium*, on observe une répression de ce transporteur via Fur, dépendante du fer mais aussi dépendante du manganèse (Ikeda, Janakiraman et al. 2005). Alors que l'homologue chez *Sinorhizobium meliloti* SitABCD est réprimé principalement par le manganèse via Fur (renommé dans ce cas là Mur) (Chao, Becker et al. 2004).

#### 2.2.1.2 Le régulateur PerR (Peroxide regulator)

D'abord caractérisé chez *Bacillus subtilis* (Bsat, Chen et al. 1996), PerR a aussi été caractérisé par la suite, chez des organismes comme *Campylobacter jejuni* (van Vliet, Baillon et al. 1999), *Streptococcus pyogenes* (King, Horenstein et al. 2000), *Listeria monocytogenes* (Rea, Gahan et al. 2004), *Staphylococcus aureus* (Horsburgh, Ingham et al. 2001), *Synechocystis* sp. (Li, Singh et al. 2004). Cependant, il n'existerait pas d'homologues chez des bactéries comme *S. Typhimurium*, *E. coli* ou *Xanthomonas campestris*.

PerR est un répresseur métallo-dépendant (figure 2). En effet, il doit se lier au manganèse pour pouvoir se fixer à l'ADN et effectuer une répression (Bsat, Chen et al. 1996). PerR peut aussi se lier au fer mais avec une affinité moindre donc, les gènes régulés par PerR seront aussi réprimés en présence d'une forte concentration de fer (Bsat, Chen et al. 1996). Une caractéristique atypique de ce métallo-régulateur, est qu'il peut être inactivé par l' $H_2O_2$  empêchant ainsi sa fixation et la répression des gènes régulés

(Herbig et Helmann 2001). Cependant, cette inactivation par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'est possible qu'en présence de fer et de faibles concentrations de manganèse et non en présence de fortes concentrations de manganèse (Herbig et Helmann 2001) (figure 2). Les gènes régulés par PerR, dans *B. subtilis*, sont principalement en rapport avec le stress oxydatif (Fuangthong, Herbig et al. 2002) : *kata* (catalase) impliqué dans la détoxification du peroxyde, *hemAXCDBL* (heme biosynthesis), *zosA* un gène codant pour un composant d'un transporteur de zinc, *mrgA* (*dps*) une protéine chélateur du fer et impliquée dans la protection de l'ADN, *ahpCF* (alkylhydroperoxide réductase), deux protéines très abondantes dans la cellule et impliquées dans la détoxification des peroxydes organiques et du peroxyde, ainsi que *fur* et *perR*. Les mêmes gènes sont aussi régulés par PerR dans *S. aureus* en plus de *trxB*, une thioredoxine réductase, elle aussi impliquée dans la détoxification des peroxydes organiques (Horsburgh, Clements et al. 2001).

### 2.2.1.3 Le régulateur Zur

Zur appartient à la même famille que Fur et PerR, il est donc un métallo-répresseur. Dans ce cas là, le métal cofacteur est le zinc. Actuellement, Zur semble ne réguler que *zosA* qui code pour un des composants d'un transporteur de zinc impliqué dans une résistance à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ainsi qu'à la diamine, un agent oxydant les thiols (Gaballa et Helmann 2002). Dernièrement, chez *Xanthomonas campestris*, ce régulateur a été impliqué dans le contrôle de l'homéostasie du zinc et il a été démontré comme essentiel dans la production de polysaccharide extracellulaire et dans la virulence (Tang, Li et al. 2005).

## 2.2.2 La famille des métallo-régulateurs DtxR

### 2.2.2.1 Fer ou manganèse : Choix adapté à la physiologie des bactéries

Le premier membre de cette famille a été identifié chez la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*. La faible concentration en Fer sert souvent de signal à l'expression de gènes de virulence car l'hôte tend à priver la bactérie des nutriments essentiels que sont les métaux. L'identification de ce régulateur en est un exemple. En

effet, il est responsable de la répression, en milieu riche en fer, du gène de la toxine diphtérique, d'où son nom DtxR (Diphtheria Toxin Repressor). Par la suite, ce régulateur a aussi été impliqué dans la régulation des systèmes de transport du fer (Tao, Boyd et al. 1992). Un homologue de ce régulateur (IdeR), dépendant du fer, a ensuite été identifié dans *Mycobacterium tuberculosis* (Schmitt, Predich et al. 1995). Il semblerait que la répression dépendante du fer soit effectuée par ce répresseur et non par Fur dans les bactéries Gram positif de la branche des GC riches (Hantke 2001).

Plusieurs autres homologues ont été décrits. Cependant, ceux-ci ont une affinité plus forte pour le manganèse que pour le fer et ils ont donc été renommés MntR (Manganese Transport Regulator). Ils ont été décrits dans une grande variété de bactéries : *Bacillus subtilis* (Que et Helmann 2000) *Treponema pallidum* (TroR) (Posey, Hardham et al. 1999), *E. coli* (Patzner et Hantke 2001), *S. Typhimurium* (Kehres, Janakiraman et al. 2002), *Staphylococcus aureus* (Horsburgh, Wharton et al. 2002), *Streptococcus gordonii* (ScaR) (Jakubovics, Smith et al. 2000) et un deuxième homologue chez *Corynebacterium diphtheriae* (Schmitt 2002). D'autres homologues ayant, *in vitro*, une réponse moins tranchée vis-à-vis du métal utilisé, ont été identifiés chez *Staphylococcus epidermidis* SirR (Hill, Cockayne et al. 1998), *Streptococcus mutans* (Spatafora, Moore et al. 2001) et *Archaeoglobus fulgidus* DMR 1 (Bell, Cairns et al. 1999).

Dans une étude de mutagenèse dirigée de la protéine DtxR, exprimée dans *B. subtilis*, il a été démontré que la double mutation M10D et C102E, entraîne une préférence du régulateur DtxR pour le manganèse. Une quantité de fer plus importante, que l'on retrouve dans le mutant *fur*, est donc nécessaire pour que cette protéine mutante puisse répondre aussi au fer (Guedon et Helmann 2003). Et inversement, les mutations correspondantes dans la protéine MntR de *B. subtilis* soit D8M et E99C, permettent aux protéines mutantes d'utiliser le fer pour effectuer une répression (Guedon et Helmann 2003). De plus, ces résidus sont conservés, car on retrouve à la position 10 une méthionine chez les régulateurs dépendants du fer, et un acide aspartique ou glutamique chez les MntR. De même, on retrouve à la position 102 une cystéine chez les régulateurs dépendants du fer, et un acide glutamique chez les MntR (Guedon et Helmann 2003).

Comme il a été suggéré, ces résultats permettent de prédire l'affinité des nouveaux homologues identifiés de la famille DtxR/MntR (Guedon et Helmann 2003).

Le choix du métal cofacteur des régulateurs de la famille MntR/DtxR dépend de plusieurs facteurs : la séquence de MntR (qui détermine l'affinité), mais aussi de la disponibilité du substrat ou de la concentration intracellulaire en métal propre à chaque bactérie (Guedon et Helmann 2003). En effet, l'affinité du répresseur pour son métal (fer pour DtxR et manganèse pour MntR), peut être contrebalancée par la quantité de métal disponible. Lorsque l'homologue DtxR de *C. diphtheriae* est exprimé dans *B. subtilis*, une bactérie qui accumule plus de manganèse, il est capable de répondre au fer ainsi qu'au manganèse (Guedon et Helmann 2003). Les mêmes conclusions ont été faites sur une autre famille de métallo-régulateurs ArsR\SmtB (Cavet, Meng et al. 2002). Il est aussi possible que certains autres métaux divalents puissent activer la liaison MntR-ADN. Par exemple, la protéine MntR de *B. subtilis* peut utiliser, *in vitro*, le manganèse ( $K_d=16$  nM) le cadmium ( $K_d=7,3$  nM), mais aussi le cuivre, le zinc et le nickel mais avec une affinité moindre (de 1,3 à 2,3 mM) (Lieser, Davis et al. 2003).

#### 2.2.2.2 MntR

La protéine MntR n'a pour l'instant été impliquée que dans la répression des gènes des transporteurs de manganèse soit, ceux de la famille Nramp (MntH) ou ceux de la famille de type ABC. Il n'est pas rare de voir le gène *mntR* organisé en opéron inverse avec les gènes du transporteur *sitABCD* comme dans *S. aureus* (Horsburgh, Wharton et al. 2002) ou avec les gènes *mntH* comme dans *X. campestris* (Richer, Courville et al. 2004).

Concernant l'importance de ce répresseur dans la virulence, une expérience a été faite dans un modèle d'abcès sous cutané murin, avec une souche de *S. aureus* où l'on a introduit un plasmide qui code pour une protéine mutante DtxR (E175K). Cette protéine réprime les gènes, sous le contrôle de MntR, de façon constitutive et indépendamment des métaux. Il a été montré que cette répression constitutive affecte de manière significative la virulence (Low, Jakubovics et al. 2003). Chez le même agent pathogène, la délétion du gène *mntR* entraîne une augmentation du manganèse intracellulaire deux fois supérieure à la souche sauvage. De plus, ce même mutant a une sensibilité accrue au méthyl viologène

(modèle de générateur d'anion superoxyde intracellulaire) et montre une diminution de survie dans les cellules endothéliales humaines (Horsburgh, Wharton et al. 2002). La régulation via MntR semble donc affecter le processus de virulence.

Lorsque les protéines PerR et MntR sont présentes dans la même bactérie, MntR joue un rôle de manière indirecte dans l'activation de PerR. Dans ce cas là, MntR aura donc une importance non négligeable dans la protection de la bactérie contre le stress oxydatif (acquis via PerR), en contrôlant l'homéostasie du manganèse (Horsburgh, Wharton et al. 2002).

### **2.2.3 Les systèmes à deux composantes (ManR-ManS).**

Les systèmes à deux composantes sont des systèmes très présents dans les génomes bactériens et, nombreux sont ceux qui n'ont pas encore une fonction assignée. Le fonctionnement général fait intervenir deux protéines. La première protéine a, le plus souvent, une activité histidine kinase. Celle-ci sera activée par son ligand, ce qui entraînera la phosphorylation d'une deuxième protéine. La deuxième protéine sera activée et se liera à l'ADN pour réguler les gènes concernés.

Dans le cas de ManR-ManS, une forte concentration de manganèse extracellulaire entraînera l'activation de ManS, qui lui activera ManR. ManR se liera donc à l'ADN et réprimera certains gènes. En cas d'absence de manganèse ManS ne génère pas de signal, donc n'active pas ManR, il n'y a donc plus de répression via ManR (Yamaguchi, Suzuki et al. 2002). Ce système a été décrit chez certaines espèces de cyanobactéries dont *Synechocystis* sp. (Ogawa, Bao et al. 2002) et *Anabaena* sp. (Huang et Wu 2004), comme régulateur des gènes codant pour les transporteurs de manganèse dont MntCAB (famille de type ABC) (Ogawa, Bao et al. 2002) et MntH (Huang et Wu 2004) ainsi que Alr5134, une protéine membranaire dont la fonction est inconnue (Huang et Wu 2004). Cependant, pour l'instant aucun système à deux composantes régulant l'homéostasie du manganèse n'a été décrit dans les  $\gamma$ -protéobactéries.

## 2.3 Les transporteurs de manganèse

### 2.3.1 La superfamille Nramp

#### 2.3.1.1 Transferts Horizontaux de Gènes (THG)

Tout au long de l'étude qui est présentée dans ce mémoire, les phénomènes de Transferts Horizontaux de Gènes (THG) seront mentionnés de façon récurrente. De plus, ces phénomènes font partie intégrante de l'évolution de la famille Nramp. Il est donc nécessaire d'expliquer brièvement en quoi ils consistent. L'extraordinaire diversité génétique des bactéries peut être expliquée par différents phénomènes. On peut citer notamment des modifications internes des informations génétiques, comme les mutations (Whittam, Neidhardt et al. 1996) et les recombinaisons homologues inter-génomique (Milkman 1997). Celles-ci vont entraîner une évolution lente, mais continue, des gènes déjà existants. Mais on peut aussi, et surtout, expliquer l'évolution des bactéries par l'acquisition de groupes de gènes d'autres espèces grâce aux processus de transferts horizontaux (ou latéraux) de gènes (THG) (Syvanen 1994). Ces processus peuvent mener à une évolution rapide de la bactérie entraînant l'émergence de nouveaux variants bactériens (par exemple apparition de variants bactériens résistants aux antibiotiques, ou de souches pathogènes).

Les gènes bactériens transférés horizontalement sont nombreux cependant, tous ne sont pas conservés de manière égale. En effet, pour que le gène soit intégré au génome et soit conservé fonctionnel, celui-ci doit représenter un avantage pour la bactérie receveuse dans certaines conditions (Lawrence 1999). Il a été observé que les gènes, transférés horizontalement, ont tendance à se regrouper en opéron, probablement pour faciliter l'acquisition de ces nouveaux gènes dans un génome naïf, et apporter une nouvelle fonction en un seul transfert, cette hypothèse est appelée "opérons autosuffisants" (Lawrence et Roth 1996). Cependant, cette hypothèse a été récemment mise en doute. En effet, la formation des opérons ne serait pas médiée par les THG, mais plus par la co-régulation (Price, Huang et al. 2005). Les THG ne seraient donc pas la cause de la

formation des opérons, mais ils permettraient de transférer des opérons préexistants (Price, Huang et al. 2005).

Il existe trois processus principaux qui facilitent les THG (Dutta et Pan 2002) : la transformation bactérienne, la transduction, et la conjugaison. La transformation bactérienne est le processus par lequel une bactérie compétente va laisser entrer de l'ADN exogène (par exemple provenant de la lyse d'une autre bactérie). La transduction est l'incorporation de matériel génétique, médiée par un bactériophage. Certains bactériophages vont incorporer des fragments d'ADN génomique bactérien lors de leur encapsidation, et vont donc les transmettre à une nouvelle bactérie lors de l'infection. Et finalement, la conjugaison est le processus par lequel est transmis de l'ADN (plasmides ou transposons) d'un donneur vers une bactérie réceptrice, via la formation de pili. L'information génétique pénétrant ainsi dans la bactérie pourra survivre sous forme d'épisomes, ou s'intégrer dans le génome par recombinaison homologue, à l'aide d'éléments mobiles (transposons, intégrase...) ou grâce à une incorporation illégitime en profitant d'une cassure dans l'ADN.

Pour détecter des gènes transférés par THG, il existe différentes méthodes résumées dans la publication suivante de Philippe et Douady (2003). On peut citer notamment : une phylogénie du gène anormale déduite des similarités de séquences comme par exemple, lorsqu'un gène démontre une plus grande similarité avec celui d'une espèce très éloignée qu'avec celui d'une espèce proche. On peut aussi citer, dans certains cas, un taux de GC différent du reste du génome (si le pourcentage du donneur est différent du pourcentage du receveur) ou la présence d'éléments mobiles ou de phages adjacents etc.

### 2.3.1.2 Historique de la famille Nramp

Il existe plusieurs lignées de souris qui présentent une susceptibilité accrue aux agents pathogènes intracellulaires du macrophage comme *Leishmania donovani* (*Lsh*) (Bradley 1974), *Mycobacterium tuberculosis* (*Bcg*) (Pelletier, Forget et al. 1982) et *Salmonella* Typhimurium (*Ity*) (Plant et Glynn 1976). Ces susceptibilités ont toutes été associées à un locus situé sur le chromosome I de la souris (Mock, Krall et al. 1990). Le gène responsable, dans ce locus, a été caractérisé définitivement en 1993 avec la

découverte de *Nramp1* (Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1) ou *Slc11a1* (Solute carrier family 11 member 1) (Vidal, Malo et al. 1993). Seule, une substitution (Gly169Asp), dans le segment trans-membranaire 4 de *Nramp1*, menant à l'absence de protéine mature, est responsable de la susceptibilité de ces lignées de souris (Vidal, Malo et al. 1993). Malgré tout, une délétion du gène *Nramp1* entraîne aussi ces susceptibilités (Vidal, Tremblay et al. 1995). Par la suite, l'homologue humain, *NRAMP1*, a été caractérisé (Cellier, Govoni et al. 1994). En 1995 un second gène codant pour un homologue de la protéine *Nramp1* a été identifié chez la souris (Gruenheid, Cellier et al. 1995) et sur le locus 12q13 chez l'homme, et fut appelé *Nramp2* (Vidal, Belouchi et al. 1995).

La protéine *Nramp2* est exprimée dans de nombreux tissus mais à des taux plus élevés au niveau du duodénum et de l'intestin (Canonne-Hergaux, Gruenheid et al. 1999). Elle est associée à une fonction de captage de fer et de manganèse par un phénomène indépendant de la transferrine au niveau de l'intestin et par un phénomène dépendant et indépendant de la transferrine dans les autres tissus (Forbes et Gros 2001). *Nramp2* a aussi un rôle dans le recyclage du fer par les macrophages (Jabado, Canonne-Hergaux et al. 2002). Une mutation Gly185Arg dans la protéine *Nramp2*, entraîne chez le rat et la souris, une anémie microcytique sévère associée à un défaut du captage du fer dans l'intestin et les autres tissus (Andrews 2000).

La protéine *Nramp1* est exprimée principalement dans les macrophages ou les granulocytes (Vidal, Malo et al. 1993). Chez les phagocytes professionnels au repos, la protéine *Nramp1* est localisée avec le marqueur Lamp-1, dans la membrane des lysosomes ou des endosomes tardifs. Lors de la phagocytose, la protéine *Nramp1* est recrutée rapidement au niveau du phagosome (Gruenheid, Pinner et al. 1997). Le rôle que joue cette protéine dans le processus d'infection a donné naissance à de nombreuses spéculations. C'est suite à la découverte d'un homologue dans d'autres espèces, comme *S. cerevisiae*, que le substrat de *Nramp1* a pu être identifié (Supek, Supekova et al. 1996; Supek, Supekova et al. 1997) puis confirmé (Jabado, Jankowski et al. 2000). En effet, *Nramp1* a été décrite comme transporteur de métaux en particulier de manganèse et de fer. Les membres de la famille *Nramp* caractérisés, à ce jour, sont des symporteurs de métaux et de protons comme dans le cas de *Nramp2* (Gunshin, Mackenzie et al. 1997),



Smf1 chez la levure (Chen, Peng et al. 1999) et MntH chez *E. coli* (Courville, Chaloupka et al. 2004) et donc, la fonction attribuée actuellement à Nramp1 est de transporter les métaux (manganèse et fer) vers le cytoplasme à l'aide du gradient de protons. Ceci, dans le but de diminuer l'accessibilité aux agents pathogènes présents dans le phagosome, des nutriments essentiels que sont les métaux, ce qui augmenterait l'activité bactéricide (Jabado, Jankowski et al. 2000) (figure 4).

Actuellement, des membres de cette famille ont été identifiés chez plusieurs espèces, chez les plantes et les levures (Cellier, Prive et al. 1995) ainsi que chez les bactéries où elles ont été renommées MntH (Manganese Transporter Proton Dependant) (Makui, Roig et al. 2000).

### Figure 3. Représentation schématique de l'évolution de la famille Nramp/MntH.

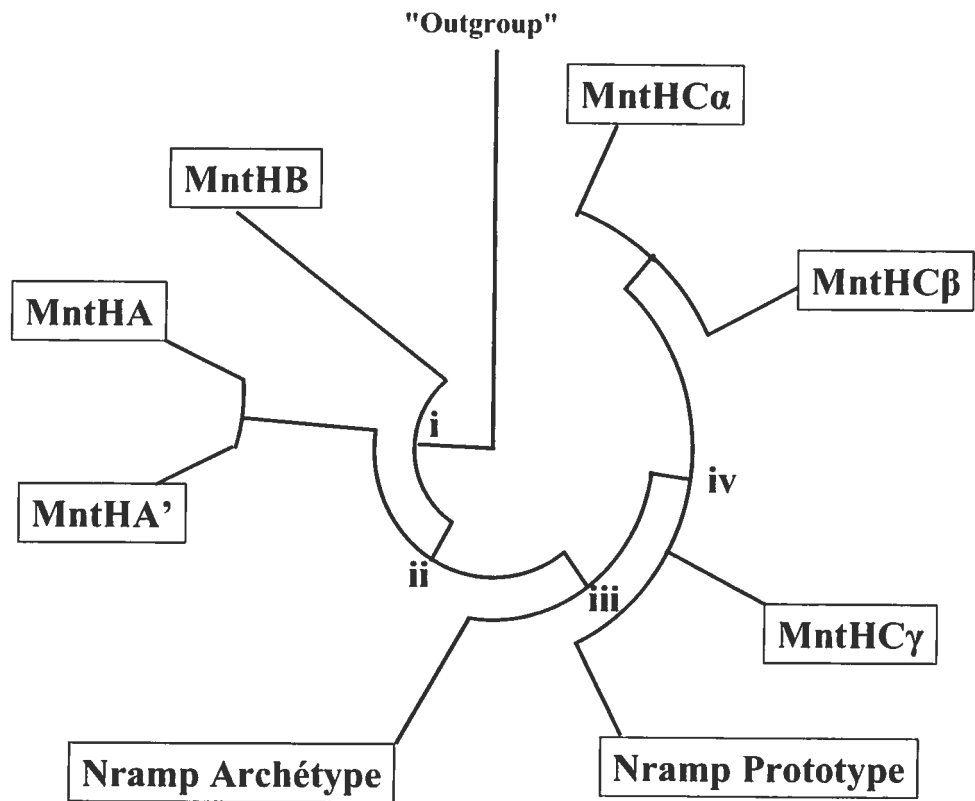
Cette figure est adaptée de (Cellier, Bergevin et al. 2001; Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et al. 2004) et résume les analyses phylogéniques de la famille Nramp/MntH. L'analyse phylogénique des séquences des protéines Nramp/MntH a permis de les subdiviser en différents groupes (A, A', B, C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ , Nramp prototype et Nramp archétype).

Le premier nœud scinde les protéines du groupe B, les plus distantes du reste de la famille. On retrouve ces protéines dans des espèces bactériennes qui préfèrent l'anaérobiose comme *Clostridium acetobutylicum*, *Chlorobium tepidum*, *Thermoanaerobacter tencongensis*, *Bacteroides fragilis*...Ce qui suggère que ces protéines, ayant divergé tôt au cours de l'évolution de la vie, auraient pu évoluer en absence d'oxygène (Richer, Courville et al. 2003).

Un deuxième nœud reflète la séparation des protéines du groupe A (A et A'). On retrouve des protéines de groupe A dans des espèces bactériennes aussi bien Gram négatif (*Erwinia chrysantemi*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Serratia marcescens* ...) que Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Clostridium acetobutylicum*...). Les protéines de groupe A' se retrouvent dans les génomes des  $\alpha$ -protéobactéries (*Rhodobacter capsulatus*), des  $\beta$ -protéobactéries (*Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*, *B. cepacia*) des  $\gamma$ -protéobactéries (*S. marcescens*).

Le troisième nœud reflète la divergence entre les protéines Nramp et MntH A et B. Cette divergence refléterait l'évolution normale de la vie en marquant la séparation lors de l'apparition des eucaryotes. Dans ce groupe, on retrouve deux groupes de protéines Nramp archétype et prototype. Les protéines Nramp archétype appartiennent à des espèces eucaryotes complexes comme par exemple des invertébrés, des vertébrés et des plantes, alors que le prototype se retrouve dans des espèces eucaryotes primaires (protozoaire et invertébrés).

Le quatrième nœud marque la séparation entre des protéines Nramp prototype, avec un nouveau groupe de protéines MntH bactériennes (MntH C). Dans ce groupe C on retrouve des protéines appartenant à différentes espèces comme les cyanobactéries (*N. punctiforme*), des Gram positifs (*Listeria spp.*, *Streptococcus mutans*) et des Gram négatifs (*Wigglesworthia brevivalpis*, *Xanthomonas campestris*).



### 2.3.1.3 Schéma évolutif de la superfamille Nramp

Avec l'avancement des séquençages génomiques bactériens, de nombreuses séquences géniques et protéiques sont aujourd'hui accessibles et peuvent être utilisées pour effectuer des analyses phylogéniques afin de formuler une hypothèse concernant l'évolution de cette famille (Cellier, Bergevin et al. 2001; Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et al. 2004). Les résultats de tests statistiques, éprouvés en utilisant différentes méthodes, ont permis de subdiviser les protéines de la famille Nramp/MntH en différents groupes (figure 3) (Cellier, Bergevin et al. 2001; Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et al. 2004). Chez les bactéries, on retrouve des gènes codant pour une protéine MntH chez un grand nombre d'espèces autant chez les Gram négatifs que positifs. Les protéines MntH bactériennes ont été divisées en trois groupes principaux A, B, et C. Le groupe A comprend deux sous-groupes A et A', et le groupe C trois sous-groupes C $\alpha$ , C $\beta$ , et C $\gamma$ . Les protéines de la famille Nramp (non-bactériennes), appartiennent à deux groupes, archétype Nramp et prototype Nramp. Ces divisions, pourraient correspondre à des étapes successives dans l'évolution de cette famille, et sont schématisées sur la figure 3 (Cellier, Bergevin et al. 2001; Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et al. 2004).

Si les protéines bactériennes des groupes A et B, ont une position attendue sur l'arbre phylogénique, il n'en est pas de même pour tous les groupes. Les protéines du groupe C ont une position atypique en effet, on les retrouve dans un groupe qui comprend des homologues eucaryotes (figure 3). Au niveau de leur séquence, mais aussi de leur profil d'hydrophobicité, les protéines MntH de groupe C ont plus de similarités avec les protéines Nramp prototypes (eucaryotes primaires) qu'avec les autres protéines bactériennes (groupes A et B). Ceci est reflété par la position du groupe après le nœud marquant la séparation procaryote/eucaryote, sur l'arbre phylogénique (figure 3). En plus de sa position atypique sur l'arbre phylogénétique (évolution vis-à-vis des autres groupes) la phylogénie basée sur les séquences des protéines MntH de groupe C est différente de celle basée sur l'ADNr 16S. Ceci suggère fortement une évolution différente de ces protéines par rapport au reste de leur génome respectif. Cette particularité d'évolution pourrait être explicable par la possibilité de transferts horizontaux de protéines MntH de groupe C (Cellier, Bergevin et al. 2001; Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et

al. 2004). Il existe plusieurs indications de transferts horizontaux de protéine MntH de groupe C, déjà répertoriés. C'est le cas de la protéine WbreC $\beta$ , de la bactérie *Wigglesworthia brevialpis*, un parasite intracellulaire obligatoire de la mouche Tsé-Tsé, vecteur du trypanosome africain. On retrouve le gène codant pour la protéine MntH de *W. brevialpis*, associée avec un gène d'ARNt, élément qui est important dans les processus de THG (Richer, Courville et al. 2003). De plus, les gènes retrouvés chez les streptocoques oraux (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. gordonii*), codant pour des protéines MntH de groupe C, sont tous associés avec des éléments IS, qui sont importants dans les processus de THG (Richer, Courville et al. 2003). Il existe aussi certains exemples de co-existence de gènes codant pour des protéines MntH de groupe C, avec des gènes codant pour des protéines MntH tronquées (pseudo-gènes). On peut citer l'exemple de *Lactococcus lactis*, qui détient un gène codant pour une protéine MntH de groupe C $\gamma$  et une protéine tronquée de groupe B (Richer, Courville et al. 2003). Il est donc suggéré que la phylogénie, propre aux protéines MntH de groupe C, puisse être due à l'existence de transferts horizontaux de bactérie à bactérie. De plus, la similarité des protéines MntH de groupe C avec les protéines prototypes Nramp, suggère que les protéines MntH de groupe C pourraient résulter d'un transfert horizontal d'un gène codant pour une protéine prototype Nramp, des eucaryotes vers une espèce procaryote (Cellier, Bergevin et al. 2001; Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et al. 2004). Enfin, la co-existence de pseudo-gène avec des gènes de groupe C, suggère que les protéines du groupe C représenteraient un avantage en comparaison avec celles des autres groupes (processus de sélection) (Richer, Courville et al. 2003; Richer, Courville et al. 2004). De la même façon, la phylogénie du groupe A' est différente de celle basée sur l'ADNr 16S, ce qui suggère, là encore, une acquisition par transfert horizontal (Richer, Courville et al. 2004). Le groupe A' est divisé en deux sous-groupes. Le premier contient des protéines proches phylogénétiquement, appartenant à des espèces du genre  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ -protéobactéries, dont l'organisation génomique est très différente d'une espèce à l'autre (Richer, Courville et al. 2004). Par contre, le sous-groupe A'2, qui contient des protéines appartenant à des  $\beta$ -protéobactéries, ont une organisation génomique similaire (Richer, Courville et al. 2004). Cependant, l'expression dans *E. coli* de protéines de différents groupes, y compris de

groupe C, montre que la fonction de transport de cations divalents est conservée (Richer, Courville et al. 2003).

#### 2.3.1.4 Transport de métal par MntH et régulation de *mntH*

Des études structurales ont été effectuées sur la protéine membranaire MntH, de groupe A de *E. coli*, et la structure prédite est de 11 segments trans-membranaires, (Courville, Chaloupka et al. 2004). Plusieurs études, effectuées sur les protéines MntH de *Salmonella Typhimurium* et *E. coli*, prouvent que cette protéine a une affinité plus forte pour le manganèse cependant celle-ci pourrait aussi transporter d'autres métaux avec une affinité moindre (Kehres, Zaharik et al. 2000; Makui, Roig et al. 2000). De la même façon, la protéine DCT1 (Nramp2), chez le rat, est capable de transporter un grand nombre de cations divalents comme  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  (Gunshin, Mackenzie et al. 1997). La surexpression de la protéine MntH chez *E. coli* entraîne une augmentation de l'entrée de  $^{55}\text{Fe}^{2+}$ , et de  $^{54}\text{Mn}^{2+}$ . De plus, l'entrée de manganèse est inhibée par la présence de cadmium, de nickel et de fer. La même surexpression entraîne une augmentation de la sensibilité à certains métaux dont le  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  (Makui, Roig et al. 2000). Chez *S. Typhimurium*, surexprimant MntH, l'entrée du  $^{54}\text{Mn}^{2+}$  à pH=5,5 est inhibée principalement par le Cd ( $K_i=0,3\mu\text{M}$ ),  $\text{Fe}^{2+}$  ( $K_i=7\mu\text{M}$ ),  $\text{Co}^{2+}$  ( $K_i=15\mu\text{M}$ ), et moins par  $\text{Pb}^{2+}$  ( $K_i=50\mu\text{M}$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  ( $K_i=100\mu\text{M}$ ),  $\text{Ni}^{2+}$  ( $K_i=125\mu\text{M}$ ),  $\text{Cu}^{2+}$  ( $K_i=150\mu\text{M}$ ) (Kehres, Zaharik et al. 2000). Il est donc clair que, dans les conditions testées, MntH peut transporter le Mn, Cd, Fe, Co (par ordre de préférence). Malgré tout, ce transport peut être modulé par d'autres paramètres comme la teneur du milieu en différents métaux ou leur concentration intracellulaire.

**Métallo-régulation de *mntH* :** La régulation de *mntH* a été bien étudiée chez *E. coli* ainsi que chez *S. Typhimurim*. Chez *E. coli*, *mntH* est réprimé principalement en présence de fer ou de manganèse, toutefois, on observe aussi une répression en présence de cobalt et de nickel (Patzer et Hantke 2001; Bergevin 2003). Les régulateurs Fur (présenté à la section 2.2.1.1) et MntR (présenté à la section 2.2.2.2) sont les deux régulateurs métallo-dépendants de *mntH* identifiés à ce jour chez *E. coli* (Patzer et Hantke 2001; Bergevin

2003) et *S. Typhimurium* (Kehres, Janakiraman et al. 2002; Ikeda, Janakiraman et al. 2005). La répression de *mntH*, en présence de fer, semble être surtout due au répresseur Fur, MntR est cependant capable de participer à la répression dépendante du fer de *mntH*, chez *E. coli* (Bergevin 2003) et *S. Typhimurium* (Ikeda, Janakiraman et al. 2005). Par contre, la répression dépendante du manganèse serait majoritairement due à MntR dans *E. coli* (Patzner et Hantke 2001; Bergevin 2003). Dans *S. Typhimurium*, il semble que celle-ci soit aussi due à Fur (Ikeda, Janakiraman et al. 2005). Dans d'autres espèces comme *Bacillus subtilis*, seule une répression via MntR, et dépendante du manganèse, a été observée (Que et Helmann 2000). De même chez *Anabaena* sp., pour l'instant, seul le système à deux composants ManR-ManS régule *mntH* d'une façon dépendante du manganèse (Huang et Wu 2004). D'autre part, chez *E. coli* (Bergevin 2003) et *S. Typhimurium* (Ikeda, Janakiraman et al. 2005), la répression du gène *mntH*, dépendante du cobalt, est principalement due à Fur.

Régulation de *mntH* par le stress oxydatif: *mntH* est régulé à la hausse en présence d' $H_2O_2$  chez *S. Typhimurium* (Kehres, Zaharik et al. 2000) et *E. coli* (Bergevin 2003). Chez *S. Typhimurium*, une séquence ressemblant à celle où se lierait le régulateur OxyR, a été identifiée (Kehres, Janakiraman et al. 2002). Ce régulateur est responsable de l'activation de nombreux gènes en rapport avec le stress oxydatif (Christman, Morgan et al. 1985). De plus, il est capable de réagir directement avec le peroxyde d'hydrogène ce qui entraîne la formation de ponts disulfures et l'activation de OxyR. Celui-ci peut alors se fixer sur des motifs conservés dans les promoteurs de certains gènes, et stimuler ainsi leur transcription (Christman, Morgan et al. 1985). Lorsque le site du promoteur de *mntH* est muté ou en absence de OxyR, le gène *mntH* de *S. Typhimurium*, n'est plus activé par l' $H_2O_2$  (Kehres, Janakiraman et al. 2002). Le manganèse est souvent associé avec une protection contre le stress oxydatif (section 2.1.2), qu'il soit de type anion superoxyde ou peroxyde. Il n'est donc pas surprenant de voir le gène *mntH* régulé à la hausse en présence de peroxyde d'hydrogène mais, curieusement, ce gène n'est pas induit en présence de paraquat, un générateur d'anions superoxydes (Kehres, Zaharik et al. 2000) De plus, chez *E. coli*, *mntH* est induit lors d'un stress provoqué par l'oxyde nitrique (NO) en anaérobiose (Justino, Vicente et al. 2005). Fur est inactivé par la présence de NO

(D'Autreaux, Touati et al. 2002), cette induction pourrait être due à une diminution de la répression dépendante de Fur.

### 2.3.2 Transporteurs de la superfamille de type ABC

Ce type de transporteurs appartient à une superfamille bien connue de transporteurs que l'on retrouve chez de nombreuses espèces, autant chez l'homme que chez les bactéries (Higgins 1992). Le principe de fonctionnement est semblable pour tous les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette). Ils sont constitués d'un récepteur périplasmique soluble ayant une forte affinité pour son substrat, d'une ou deux protéines associées à la membrane cytoplasmique, et d'une ou deux protéines fixant et hydrolysant l'ATP et fournissant ainsi l'énergie (Higgins 1992). Chez les bactéries Gram positif, le récepteur soluble est remplacé par une lipoprotéine ancrée à la membrane externe (Sutcliffe et Russell 1995). Cette famille comprend des transporteurs d'une grande variété de substrats. Il en existe certains qui sont spécialisés dans le transport des métaux et notamment du manganèse. Des homologues de ces systèmes de transport ont été identifiés chez de nombreuses bactéries comme *Salmonella Typhimurium* (SitABCD) (Zhou, Hardt et al. 1999), *Yersinia pestis* (YfeABCD) (Bearden, Staggs et al. 1998), *Shigella flexneri* (SitABCD) (Runyen-Janecky, Reeves et al. 2003), certaines souches de *E. coli* pathogènes comme CFT073, *Corynebacterium diphtheriae* (MntABCD), *Sinorhizobium meliloti* (SitABCD), *Streptococcus pneumoniae* (PsaBCA), *Streptococcus gordonii* ScaCBA, *Streptococcus mutans* SloABC, *Streptococcus pyogenes* MtsABC, *Treponema pallidum* TroABC, *Enterococcus faecalis* EfaABC, *S. parasynguinis* FimA (Kehres et Maguire 2003).

Dans certains cas, ces transporteurs semblent avoir une affinité supérieure pour le manganèse mais, il semble que ceux-ci soient aussi capables de transporter le fer. SitABCD de *S. Typhimurium* en est un exemple. Celle-ci transporte aussi le fer mais avec une affinité 30 à 100 fois moins importante que celle du manganèse (Boyer, Bergevin et al. 2002; Kehres, Janakiraman et al. 2002). Les régulateurs qui modulent la transcription de ces gènes ne sont pas encore tous identifiés. De plus, comme dans le cas de *mntH*, elle semble varier en fonction des espèces. Chez *S. Typhimurium*, il semble que sa métal-



régulation soit similaire à celle de *mntH*. En effet, on observe une régulation dépendante du fer, via le régulateur Fur et moindrement par MntR, et une régulation dépendante du manganèse via MntR et moindrement par Fur (Ikeda, Janakiraman et al. 2005). En comparaison, chez *Yersinia pestis*, qui n'a pas de MntR, la répression de *yfeABC*, dépendante du fer et du manganèse, est due exclusivement à Fur (Runyen-Janecky, Reeves et al. 2003; Chao, Becker et al. 2004).

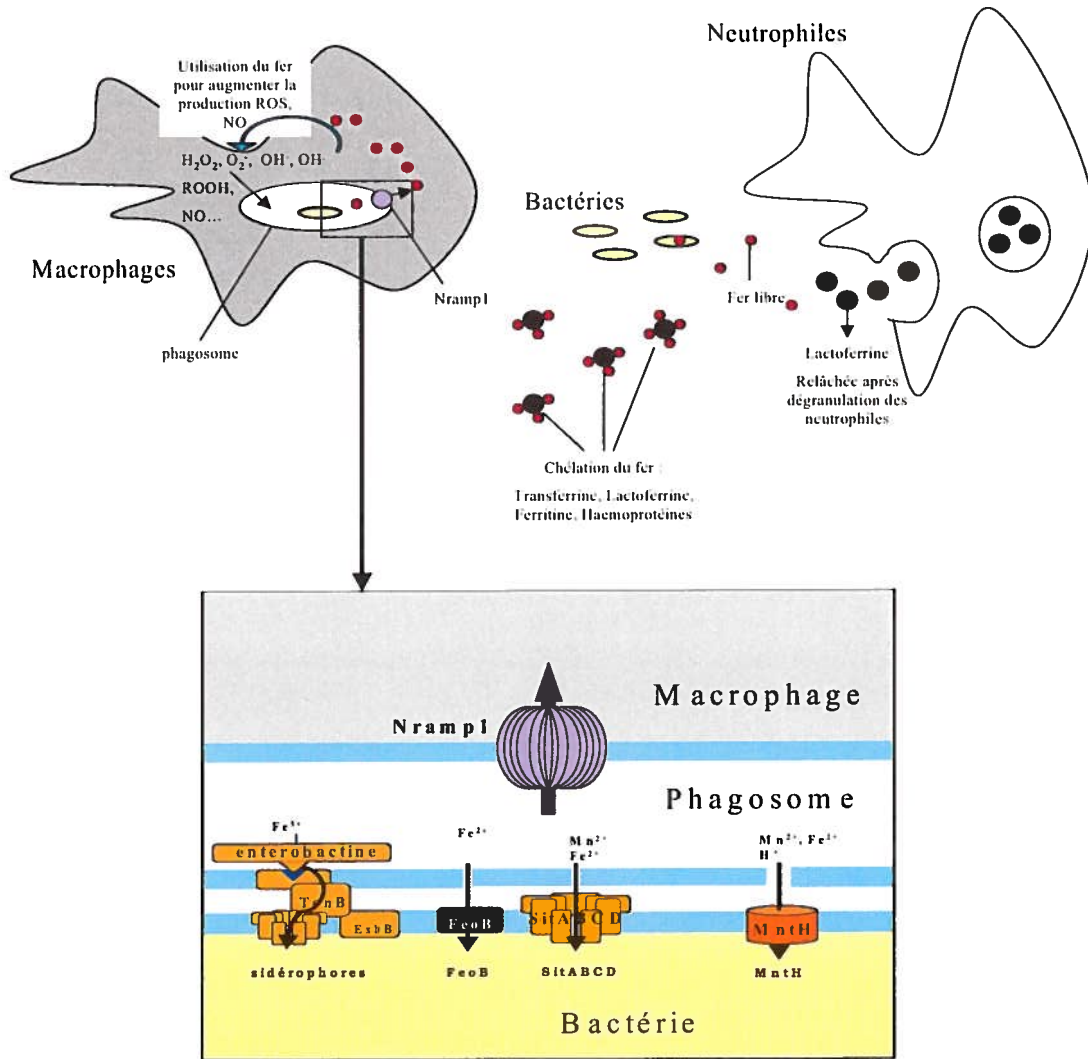
### 2.3.3 Transporteurs de la famille P-Type ATPase et autres transporteurs

Comme la superfamille des transporteurs ABC, la superfamille des transporteurs P-type ATPase utilise aussi l'ATP comme source d'énergie. Ces transporteurs ont tous comme substrat des cations comme par exemple  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ , et  $Cd^{2+}$  (Silver et Walderhaug 1992), et  $Cu^{2+}$  (Odermatt, Suter et al. 1993). Une protéine, renommée MntA, a été identifiée chez *Lactobacillus plantarum*. Cette protéine est un membre de cette famille et transporte le manganèse mais aussi le cadmium (Hao, Chen et al. 1999). Un homologue a aussi été identifié chez *Caenorhabditis elegans* (Lapinskas, Cunningham et al. 1995), mais il ne semble pas y avoir d'homologue chez les  $\gamma$ -protéobactéries.

Il n'a été caractérisé aucun autre transporteur de manganèse chez les bactéries mais, il est très probable que d'autres transporteurs de métaux puissent transporter aussi le manganèse mais avec une affinité moins forte que leur substrat préférentiel. On peut citer notamment l'exemple de ZupT. Cette protéine est un membre de la superfamille des Zip-protéines que l'on retrouve aussi chez les eucaryotes. Chez *E. coli*, elle est capable de transporter le zinc, le fer, et le cobalt et sa surexpression entraîne une augmentation de la sensibilité au manganèse (Grass, Franke et al. 2005). Un autre exemple est l'un des deux homologues FeoB de *Porphyromonas gingivalis*, qui semble jouer un rôle important dans l'accumulation de manganèse (Dashper, Butler et al. 2005).

**Figure 4. Représentation schématique de l'hypothèse de compétition pour l'acquisition des métaux.**

D'après (Forbes et Gros 2001; Schaible et Kaufmann 2004). L'hôte va diminuer l'accès aux métaux grâce, entre autres, à la lactoferrine présente lors de la dégranulation des neutrophiles ou à Nramp1 dans le phagosome. En contrepartie, la bactérie pathogène exprime un arsenal de transporteurs, visant à détourner les ressources de l'hôte et dont certains sont représentés ici.



## 2.4 Importance des métaux dans la relation hôte-pathogène : Hypothèse de compétition

Que ce soit dans le cas d'un phyto-pathogène comme *X. campestris* (Expert, Enard et al. 1996) ou d'un agent pathogène de mammifère comme *S. Typhimurium* (Schaible et Kaufmann 2004), les métaux ont un rôle à jouer dans la réponse immunitaire. Malgré tout, le rôle du fer est beaucoup plus connu que celui du manganèse cependant, il semble imaginable que les systèmes soient similaires. Le fer et les autres métaux, sont des facteurs de croissance importants pour la bactérie. Ils vont participer à de nombreuses réactions métaboliques et interviennent dans la protection contre le stress oxydatif. Chez l'hôte, les métaux vont, entre autres, participer à la production des ROS et NO. De plus, l'hôte a développé des moyens de défense, dont l'un consiste à diminuer l'accès des métaux aux bactéries (figure 4).

À cette fin, l'hôte a développé de nombreux systèmes permettant de capter les métaux dans les différents fluides. On peut citer les protéines de transport et de stockage du fer comme les lactoferrines, les transferrines et les ferritines, et les haemoprotéines (Hentze, Muckenthaler et al. 2004). Cependant, ces molécules ne servent pas à l'hôte seulement dans le domaine immunologique. En effet, celles-ci auront un rôle à jouer dans le captage du fer dans les différents tissus et permettront le stockage du fer libre, hautement réactif et toxique (Hentze, Muckenthaler et al. 2004). Cependant, chez les mammifères, la lactoferrine qui est présente dans le lait, la salive, le sérum et les blessures, est relâchée lors de la dégranulation des neutrophiles (Ward, Uribe-Luna et al. 2002) (figure 4). Il a été prouvé que la lactoferrine complexe le fer avec une haute affinité et joue le rôle le plus important au niveau de la défense immunitaire innée, dans le cas d'une infection par *Pseudomonas aeruginosa* (Singh, Parsek et al. 2002), *Candida albicans* (Tanida, Rao et al. 2001; Ueta, Tanida et al. 2001), *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* ou certaines entérobactéries (Singh, Parsek et al. 2002; Ward, Uribe-Luna et al. 2002).

L'hôte diminuera aussi l'accès aux métaux, lorsque les agents pathogènes sont enfermés dans les phagosomes des macrophages, créant ainsi un micro-environnement aux conditions hautement bactéricides (protéases, pH acide, taux métaux faibles, présence

de ROS, et NO...) (figure 4). Ce retrait des métaux du phagosome est dû à la protéine Nramp1 (Forbes et Gros 2001). Cette protéine est un transporteur de métaux divalents (fer et manganèse). Elle est essentielle, chez la souris, à la protection contre certaines espèces d'agents pathogènes intracellulaires du macrophage comme *Mycobacterium*, *Salmonella*, et *Leishmania*.

Les bactéries pathogènes ont cependant développé de nombreux systèmes à très haute affinité pour détourner les métaux (figure 4), dans le but de faire compétition avec la restriction imposée par l'hôte. Dans certains cas, ces transporteurs sont des facteurs de virulence et leur élimination entraîne une diminution de virulence. On peut citer notamment les mycobactines et les exochelines chez les mycobactéries, et les entérobactines chez les entérobactéries (Andrews, Robinson et al. 2003). Ces petites molécules sont des sidérophores qui chélatent le fer avec une très haute affinité. Par la suite, le complexe sera lié à un récepteur et le fer sera transporté vers l'intérieur, par un mécanisme dépendant de TonB. Les bactéries disposent d'autres transporteurs comme FeoB, ou des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette ex : SitABCD) (Andrews, Robinson et al. 2003). FeoB hydrolyse le GTP pour un transport actif de  $Fe^{2+}$  (Kammler, Schon *et al.* 1993; Marlovits, Haase *et al.* 2002). Les transporteurs de types ABC (SitABCD), utilisent l'ATP pour un transport de  $Mn^{2+}$  et de  $Fe^{2+}$  (Kehres, Janakiraman et al. 2002). Un autre type de transporteurs correspond aux protéines de la famille Nramp, appelées chez les procaryotes MntH, qui sont des transporteurs de manganèse même s'ils sont aussi capables de transporter d'autres métaux (Makui, Roig et al. 2000). Enfin, certains agents pathogènes ont aussi développé des récepteurs à lactoferrine ou transferrine comme, par exemple, chez *Neisseria* ou *Haemophilus* (Schryvers et Gray-Owen 1992; Stevenson, Williams *et al.* 1992). L'hôte et l'agent pathogène ont donc développé des outils compétitifs pour acquérir les métaux (figure 4).

De plus, le fait que l'agent pathogène se retrouve dans un environnement où le fer (ou d'autres métaux) est très peu présent va souvent servir de signal à l'expression de gènes de virulence. On peut citer le cas du régulateur DtxR qui régule la production de la toxine diphtérique (Schmitt et Holmes 1991) ou de Fur qui contrôle de nombreux gènes en relation avec la protection contre le stress oxydatif, le captage du fer et, chez certains agents pathogènes comme *Erwinia chrysanthemi*, celui-ci régule directement ou

indirectement le complexe de la pectate lyase, important dans la dégradation des parois cellulaires des plantes (Franza, Sauvage et al. 1999).

## 2.5 Importance des transporteurs de manganèse dans l'infection par *S. Typhimurium*

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium est un agent pathogène important. Cette bactérie, chez la souris, est responsable d'une pathologie qui ressemble à la fièvre typhoïde chez l'humain. Après ingestion, les bactéries coloniseront l'intestin grêle via les cellules M et se retrouveront ensuite dans les plaques de Peyer qui constituent de petits organes lymphoïdes secondaires (Ohl et Miller 2001). Dans ces petits organes, on retrouve une population de cellules dendritiques. Celles-ci phagocyteront les bactéries (Hopkins, Niedergang et al. 2000; Yrlid, Svensson et al. 2001). Cependant, les bactéries peuvent survivre à l'intérieur de ces cellules dendritiques après la phagocytose. Cela facilitera la dissémination des salmonelles dans le système lymphatique général (Knodler et Finlay 2001; Rescigno, Rotta *et al.* 2001). En effet, ces cellules se rendent ensuite, aux organes lymphoïdes mésentériques ou au foie où elles présenteront les antigènes aux cellules T (Hopkins, Niedergang et al. 2000; Yrlid, Svensson et al. 2001). Les salmonelles pourront alors coloniser et survivre dans les macrophages de la rate et du foie, après phagocytose (Ohl et Miller 2001).

*S. Typhimurium* est donc un agent pathogène spécialisé dans la vie intracellulaire, mais cette survie est plus difficile si le transporteur de métaux (manganèse et fer) Nramp1 est présent et fonctionnel. Il est donc clair que ces métaux jouent un rôle dans cette relation. De nombreuses études ont été faites dans le but de vérifier si les systèmes d'acquisition de manganèse bactériens influencent aussi cette relation. Cependant, le rôle de MntH dans la virulence est encore nébuleux. Le gène *mntH* est exprimé par *S. Typhimurium* durant le processus d'infection, dans un modèle de macrophages Nramp1<sup>G169</sup>, et moindrement dans un modèle Nramp1<sup>D169</sup> (absence de protéine Nramp1 mature) (Zaharik, Cullen et al. 2004). Or, la délétion génique de *mntH* n'entraîne pas de diminution de virulence chez *S. Typhimurium* dans un modèle de souris Nramp1<sup>-/-</sup> (Boyer, Bergevin et al. 2002). Il en est de même chez *S. aureus* dans un modèle d'abcès

murin (Horsburgh, Wharton et al. 2002) ou chez *M. tuberculosis*, dans un modèle de macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris C57BL/6, et dans un modèle murin de souris BALB/c (Nramp1 fonctionnel) (Domenech, Pym et al. 2002). Cependant, dans un modèle de souris Nramp1<sup>G169</sup> (Nramp1 fonctionnel), la délétion génique de *mntH* a un effet sur la virulence de *S. Typhimurium* (Zaharik, Cullen et al. 2004). D'un autre côté, le transporteur SitABCD, semble être important. En effet, les gènes codant pour ce transporteur se retrouvent dans l'îlot de pathogénicité I chez *S. Typhimurium*. Le simple mutant *S. Typhimurium sitABCD* a une virulence atténuée que ce soit dans un modèle Nramp1<sup>-/-</sup> (Boyer, Bergevin et al. 2002), ou dans un modèle Nramp1<sup>G169</sup> (Zaharik, Cullen et al. 2004). Par contre, la mutation cumulative du gène *mntH* amplifie le défaut de virulence du mutant *S. Typhimurium sitA*, dans un modèle murin Nramp1<sup>G169</sup> (Zaharik, Cullen et al. 2004). Chez *S. aureus*, dans un modèle d'abcès murin, les simples mutants *mntA* ou *mntH* n'ont pas une virulence atténuée, au contraire du double mutant (Horsburgh, Wharton et al. 2002). Il est donc clair que le manganèse affecte la virulence mais le rôle de MntH semble encore à clarifier cependant, la redondance des systèmes de transport du manganèse est un paramètre à prendre en compte.

Le double mutant *S. Typhimurium mntH, sitA-D* (MS), dans cette étude, est utilisé comme modèle de bactérie pathogène atténuée. Les mutants *S. Typhimurium mntH, SitA-D* (MS), n'ont plus de système d'acquisition du manganèse à haute affinité. En effet, le transport de manganèse par ces mutants est inférieur à 1 pmol par unité de densité optique comparativement à la souche sauvage dont le transport est d'environ 55 pmol par unité de densité optique (Boyer, Bergevin et al. 2002). Cependant, le transport de manganèse, dans les conditions testées, semble être médié majoritairement par SitABCD. Le simple mutant *sitA-D* montre un transport de manganèse inférieur à 10 pmol par unité de densité optique, contrairement au mutant *mntH* dont la valeur de transport est proche de celle de la souche sauvage (Boyer, Bergevin et al. 2002). La délétion cumulée des deux transporteurs de manganèse entraîne aussi un léger défaut de transport de Fer (Boyer, Bergevin et al. 2002). Ces deux phénotypes, ainsi que d'autres dérèglements, entraînent de nombreuses conséquences directes ou indirectes. On peut citer notamment, un défaut de croissance des mutants MS en milieu riche supplémenté de DP (2,2'-dipyridyl, un

chélateur de métaux), et une plus grande sensibilité au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Boyer, Bergevin et al. 2002). De plus, les mutants MS ont une virulence atténuée dans un modèle murin 129/Sv Nramp1<sup>-/-</sup> mais aussi, une réplication intracellulaire diminuée, dans un modèle de culture cellulaire de type macrophage RAW 264.7 Nramp1<sup>-/-</sup> (Boyer, Bergevin et al. 2002). Cependant, la majorité des phénotypes des mutants MS (transport de manganèse, croissance avec DP, sensibilité à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et réplication intracellulaires dans les cellules RAW 264.7 Nramp1<sup>-/-</sup>) peuvent être complétés en introduisant dans ces bactéries un plasmide à haut taux de copies portant le gène *mntH* et son promoteur (Boyer, Bergevin et al. 2002).

## 2.6 *Xanthomonas campestris*

Le genre *Xanthomonas* comprend de nombreuses espèces bactériennes, pour la plupart associées aux plantes. Ces bactéries sont des bacilles Gram négatifs, et appartiennent au phylum des  $\gamma$ -protéobactéries. Environ 400 plantes ont été décrites comme pouvant être infectées par l'une ou l'autre des espèces de ce genre, ce qui en fait un des genres le plus représenté. L'espèce *Xanthomonas campestris* est la plus représentée et comprend 141 pathovars (Hayward 1993). À ce jour, les séquences, complètes et assemblées, des génomes de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004, et *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913, sont disponibles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). L'absence ou la présence de certains gènes, en fonction des pathovars, dictent les différences dans la spécificité de la plante hôte (da Silva, Ferro et al. 2002). Environ 80% des gènes de *X. campestris* pv. *campestris* et *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sont conservés, de même que leur position génomique, les 20 % restants vont donc participer aux interactions spécifiques avec un ou plusieurs hôtes (da Silva, Ferro et al. 2002). À noter, que le gène *mntH* est situé dans une région du génome des *Xanthomonas*, décrite comme plastique c'est à dire une région où le réarrangement et l'insertion de gènes a un taux plus élevé (da Silva, Ferro et al. 2002).

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est utilisée, en industrie, pour la production de gomme de xanthane qui a de nombreuses propriétés applicables à



l'industrie alimentaire (gélifiant, émulsifiant, lubrifiant...). De plus, cette bactérie est l'agent pathogène causant la maladie appelée « Black rot disease » (nervation noire) chez un grand nombre de crucifères (Hayward 1993). Cette maladie cause des pertes économiques importantes en agriculture, il est donc clair que la compréhension des mécanismes d'infections pourrait avoir un impact économique. Pour résumer la pathogénèse (Chan et Goodwin 1999), la bactérie pénétrera par une ouverture naturelle ou une blessure. Les bactéries se multiplieront dans les espaces inter-cellulaires, jusqu'à confluence. Cette multiplication est associée à une augmentation de la perméabilité des cellules de la plante et une perte importante de nutriments. Les bactéries pourront dégrader les cellules adjacentes grâce à des enzymes extracellulaires. La perte des gènes, codant pour les enzymes extracellulaires, affecte grandement la capacité de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* à infecter la plante (Dow, Clarke et al. 1990; Dums, Dow et al. 1991). Parmi ces enzymes, on retrouve des endoglucanases, des pectates lyases (métallo-régulées) et les protéases PRT1 et PRT2. Ces dernières requièrent des métaux divalents pour leur stabilité et leur fonctionnement (Dow, Clarke et al. 1990). Les bactéries envahiront ensuite, les tissus vasculaires et se multiplieront, permettant ainsi la dispersion des bactéries à l'intérieur de la plante. Finalement, les bactéries entreront et se multiplieront à l'intérieur des cellules. Les symptômes seront de différents types, comme des nécroses, des hypertrophies, de la pourriture, des ulcères, et la mort de la plantes (Rudolph 1993).

Malgré tout, ce type d'infection décrit le cas où la plante est l'hôte du pathovar. Dans le cas où la plante est résistante (non-hôte), l'infection est localisée et se traduira par une réaction de la plante de type HR (Réponse d'Hypersensibilité). Cette réaction entrainera une nécrose rapide des tissus au lieu de l'infection. L'infection sera contrôlée, par circonscription de la bactérie au lieu de l'infection, empêchant ainsi la dissémination (Lam, Kato et al. 2001). La réaction d'hypersensibilité consiste au relâchement de substances bactéricides au lieu de l'infection, ainsi qu'à la mort programmée des cellules voisines (Dangl, Dietrich et al. 1996). On compte notamment parmi ces substances des composés oxygénés (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène, les peroxydes organiques, l'anion superoxyde, et les radicaux  $\text{OH}^-$  et  $\text{OH}^\cdot$ . La production, rapide, de ces composés est appelée la flambée oxydative (oxydative burst). D'autres composés bactéricides

incluent l'oxyde nitrique produit par la NOS (Oxyde Nitrique Synthétase) (Cueto, Hernandez-Perera et al. 1996; Durner, Wendehenne et al. 1998).

Il existe deux types principaux de gènes qui dictent la compatibilité ou l'incompatibilité de la plante vis à vis du pathovar. Les gènes bactériens sont regroupés sous les termes *avr* (avirulence) et *hrp* (hypersensitivity response and pathogenicity). Durant l'infection, il y aura une interaction entre la plante et l'agent pathogène, ce qui dictera la réponse immunitaire de la plante. Cette relation est nommée gène pour gène (Flor 1971). Pour que la plante soit résistante à l'agent pathogène, celle-ci doit reconnaître grâce à un gène de résistance R, une molécule produite par l'agent pathogène. Ces molécules sont codées par les gènes de type *avr*. En conséquence, l'absence ou l'altération de l'un ou l'autre des gènes conduira au développement de la maladie. D'un autre côté, l'agent pathogène possède des gènes de types *hrp*. La délétion de ces gènes entraîne une perte du pouvoir pathogène dans la plante hôte et une perte de la capacité à déclencher une réaction d'hypersensibilité chez la plante non-hôte (Bonas 1994). Les produits de certains de ces gènes possèdent une homologie avec les protéines des systèmes de sécrétion de type III de facteur de virulence (Type III secretion system) chez les bactéries pathogènes de mammifères (Fenselau, Balbo et al. 1992), et sont responsables, entre autres, du transport des produits des gènes *avr* (Gurlebeck, Thieme et al. 2005).

### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### 3.1 Souches bactériennes et milieux de culture utilisés.

Les souches utilisées lors de cette étude sont décrites dans le tableau 1. Les souches de *E. coli*, et *S. Typhimurium*, *S. marcescens*, ont été mises en culture dans le milieu LB (Luria-Bertani) (Miller 1992).

Le milieu LB supplémenté de 15 g.L<sup>-1</sup> et le milieu Top-LB supplémenté 7 g.L<sup>-1</sup> d'agar ont été utilisés pour les tests de sensibilité aux oxydants des différents mutants *E. coli* ou *S. Typhimurium*. Les tests de diffusion de métaux avec les différentes souches de *E. coli* DH11S *mntH* pBAD :: MntH ont été effectués dans du milieu GTA, avec 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar ou 7 g.L<sup>-1</sup> pour le milieu Top-GTA (Herman, Lecat et al. 1995).

Lors des marquages métaboliques, des homologues MntH, le milieu G/M (Neidhardt, Bloch et al. 1974) a été utilisé mais adapté (Makui, Roig et al. 2000). Le milieu G/M incomplet est un milieu minimal. Il a été préparé à partir d'une solution 10X (conservée à -20°C), à laquelle sont rajoutés fraîchement du Na-β-glycerophosphate, du glycérol, et de l'acide nitrilotriacétique (NTA solution 1000X), sans Fer ni micro-nutriments. Les concentrations finales sont : 40mM tampon MOPS (pH 7,4), 9,5 mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,276 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 μM CaCl<sub>2</sub>, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, 5 mM Na-β-glycerophosphate, 0,2 % glycérol, 100 μM NTA.

Lors de la transformation bactérienne par la méthode électrique ou chimique, le milieu SOC (Miller 1992) a été utilisé. Celui-ci est un milieu riche composé de 5 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levures, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, 0,186 g.L<sup>-1</sup> de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de glucose.

Sauf exception, les cultures des souches *E. coli* et *S. Typhimurium* ont été incubées à une température de 37 °C, et à une vitesse d'agitation de 250 RPM lorsque celles-ci étaient en milieu liquide. *S. marcescens* a été cultivée à 21°C, et à une vitesse d'agitation de 250 RPM.

Les souches de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ont été cultivées dans du milieu TYG (Tryptone Yeast Extract Agar), composé d'extrait de levure 5 g.L<sup>-1</sup>, tryptone 3 g.L<sup>-1</sup>, glucose 5 g.L<sup>-1</sup>, agar 20 g.L<sup>-1</sup>, pH=7. Les tests de sensibilité aux métaux ou aux oxydants ont été effectués avec du milieu SB (Silva-Buddenhagen) (Mongkolsuk, Whangsuk et al. 2000). La composition de ce milieu est : 0.5% extrait de levure, 0.5%

peptone, 0.1% acide glutamique, le pH a été ensuite ajusté à 7,0. Du sucrose (stérilisé par filtration) a été ajouté à une concentration finale de 0.5 %. Pour les milieux solides 15 g.L<sup>-1</sup> d'agar ont été ajoutés pour le milieu SB agar (SBA) et 7,5 g.L<sup>-1</sup> au milieu SB Top Agar (SBTA). À part lorsque cela est précisé, les cultures des souches *X. campestris*, ont été incubées à une température de 30 °C, et à une vitesse d'agitation de 250 RPM, lorsque celles-ci étaient en milieu liquide.

Lorsque cela est précisé, les milieux ont été supplémentés des antibiotiques aux concentrations suivantes : Ampicilline (100 µg.ml<sup>-1</sup>), Kanamycine (30 µg.ml<sup>-1</sup>), Chloramphénicol (10 µg.ml<sup>-1</sup>), Spectinomycine (100 µg.ml<sup>-1</sup>), Streptomycine (50 µg.ml<sup>-1</sup>), Tétracycline (10 µg.ml<sup>-1</sup>), Gentamycine (30 µg.ml<sup>-1</sup>).

Les Densités Optiques à 600 nm (DO<sub>600</sub>) ont été mesurées au besoin, à l'aide de l'appareil suivant : « Biochrom Ultraspec 1000 UV/Visible Spectrophotometer » (Biochrom) et des cuvettes 10X4X45 mm (Sarstedt, Allemagne).

**Tableau 1. Souches bactériennes utilisées**

Souches	caractéristiques	références
<i>E. coli</i>		
S17 $\lambda$ pir	Tp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , <i>thi pro hsdR recA::RP4:2Tet<sup>R</sup>::Mu:Km<sup>R</sup>::Tn7</i> , $\lambda$ pir lysogène	(Boyer, Bergevin et al. 2002)
DH11S	<i>mcrA Δ(mrr-hsd RMS-mrcBC) Δ(lac-proAB) Δ(recA1398) deoR supE rpsL srl thi F' proAB<sup>+</sup></i>	(Lin, Smith et al. 1992)
DH11S <i>mntII</i>	<i>mntII::Km<sup>R</sup></i>	(Makui, Roig et al. 2000)
MG1655	F' $\lambda$ rph-1	(Blattner, Plunkett et al. 1997)
MG1655 <i>mntII</i>	P <i>mntII</i> -Luc	(Bergevin 2003)
MG1655 <i>fur</i>	<i>fur::Km<sup>R</sup></i>	(Castillo, Cellier, non-publié)
MG1655 <i>fur mntII</i>	<i>fur::Km<sup>R</sup>, PmntII-Luc</i>	(Bergevin 2003)
MG1655 <i>arcA</i>	<i>arcA::Km<sup>R</sup></i>	(Tardat et Touati 1991)
EMG2	F' $\lambda$ prototrophe	(Link, Phillips et al. 1997)
EMG2 <i>mntII</i>	P <i>mntII</i> -Luc	(Bergevin 2003)
EMG2 <i>fur</i>	<i>fur::Km<sup>R</sup></i>	(Bergevin 2003)
EMG2 <i>fur mntII</i>	<i>fur::Cm<sup>R</sup>, PmntII-Luc</i>	(Bergevin 2003)
GC4468	Sm <sup>R</sup> F' $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> )U169 <i>rpsL</i>	(Carlioz et Touati 1986)
GC4468 <i>sodA</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>sodA::Tet<sup>R</sup></i>	(Touati, Jacques et al. 1995)
GC4468 <i>mntII</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>mntII::Km<sup>R</sup></i>	(Bergevin 2003)
GC4468 <i>fur</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>fur::Km<sup>R</sup></i>	(Compan et Touati 1993)
GC4468 <i>sodA mntII</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>sodA::Tet<sup>R</sup>, mntII::Km<sup>R</sup></i>	(Bergevin 2003)
GC4468 <i>sodA sodB</i>	Sm <sup>R</sup> , $\Delta$ <i>sodA3Φ(sodB::Km<sup>R</sup>)Δ2</i>	(Touati, Jacques et al. 1995)
GC4468 <i>fur, mntII</i>	Sm <sup>R</sup> , <i>fur::Cm<sup>R</sup>, mntII::Km<sup>R</sup></i>	(Castillo, Cellier, non-publié)
<i>Salmonella enterica</i>		
serovar Typhimurium	Isolat clinique	(Boyer, Bergevin et al. 2002)
souche Keller		
M ( <i>mntII</i> )	<i>mntII::pTnModRCm<sup>R</sup></i>	(Boyer, Bergevin et al. 2002)
S ( <i>sitA-D</i> )	<i>sitAD::Sm<sup>R</sup></i>	(Boyer, Bergevin et al. 2002)
MS ( <i>mntII, sitA-D</i> )	<i>mntII::pTnModRCm<sup>R</sup>, sitAD::Sm<sup>R</sup></i>	(Boyer, Bergevin et al. 2002)
M2S ( <i>mntII, sitA-D</i> )	<i>mntII::Km<sup>R</sup>, sitAD::Sm<sup>R</sup></i>	Cette étude
<i>Serratia marcescens</i>		
2170	-	(Suzuki, Uchiyama et al. 2001)
<i>Xanthomonas</i>		
<i>campestris</i> pv		(Van den Mooter et Swings 1990)
<i>campestris</i> ATCC		
33913		
H ( <i>mntII</i> )	<i>mntII::Tet<sup>R</sup></i>	Cette étude
RH ( <i>mntR-mntII</i> )	<i>mntR-mntII::Gm<sup>R</sup></i>	Cette étude
R ( <i>mntR</i> )	<i>mntR::Sm<sup>R</sup></i>	Cette étude
RH-pCRH ( <i>mntR-mntII, pCRII</i> )	<i>mntR-mntII::Gm<sup>R</sup>, pCRH(cumb-mntR-mntII) Tet<sup>R</sup></i>	Cette étude

## **3.2 Protocoles généraux concernant la manipulation d'ADN**

### **3.2.1 Extraction de plasmides**

Les plasmides, utilisés ou construits lors de cette étude, sont décrits dans le tableau 2. L'extraction des plasmides à des fins de vérification, a été effectuée par la méthode de lyse alcaline décrite précédemment (J. Sambrook 1989; Makui, Roig et al. 2000). Cependant, certaines modifications y ont été apportées, notamment les étapes de purifications par la méthode phénol-chloroforme, ainsi que le second lavage à l'éthanol lors de la précipitation, ont été abandonnées.

Lors de la purification des plasmides destinés au clonage ou au stockage, des trousseaux, provenant de la compagnie Qiagen (Mississauga, ON) basées sur la méthode de lyse alcaline modifiée (Birnboim et Doly 1979), ont été utilisées. Les manipulations, avec les trousseaux « QIAprep Spin Miniprep Kit », ont été effectuées conformément aux instructions fournies par le manufacturier.

### **3.2.2 Réactions de biologie moléculaire à l'aide d'enzymes**

Les réactions de digestion à l'aide des enzymes de restriction (NEB New England Biolabs), de déphosphorylation à l'aide de la CIP (phosphatase alcaline, New England Biolabs), de formation de bouts francs à l'aide de la T4-polymérase (New England Biolabs) et de ligation à l'aide de la T4-DNA ligase (Invitrogen), ont été effectuées conformément aux indications des manufacturiers.

Lors de la ligation, les fragments d'ADN purifiés ont été dosés sur gel. La ligation a été effectuée durant une période de 16h à 15°C et l'ADN a été précipité en ajoutant du NaCl à une concentration finale de 100 mM, du glycogène à 1 % final, et 3 volumes d'éthanol 100 %. Les échantillons ont été placés à -20 °C pendant un minimum de 4 h. Par la suite, ils ont été centrifugés à une vitesse de 14000 RPM, lavés une fois avec de l'éthanol 75 %, centrifugés à nouveau et dissous dans un volume de 4,5 µL d'H<sub>2</sub>O milliQ stérile. 2 µL ont été utilisés ensuite pour la transformation par électroporation.

Tableau 2. Plasmides utilisés

Plasmides	Résistances	Gènes et promoteurs	références
pBAD24	Amp	Aucun, promoteur inductible à l'arabinose	(Guzman, Belin et al. 1995)
pBAD ::EcolA	Amp	<i>mntI</i> <i>E. coli</i> DH11S	(Makui, Roig et al. 2000)
pBAD ::EcolA H216A	Amp	<i>mntI</i> <i>E. coli</i> muté	cette étude
pBAD ::EcolA H216R	Amp	<i>mntI</i> <i>E. coli</i> muté	cette étude
pBAD ::EcolA D34G	Amp	<i>mntI</i> <i>E. coli</i> muté	(Chaloupka, Courville et al. 2005)
pBAD ::StypA	Amp	<i>mntI</i> <i>S.Typhimurium</i> souche Keller	cette étude
pBAD ::EchrA	Amp	<i>mntI</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937	cette étude
pBAD ::SmarA	Amp	<i>mntIA</i> <i>Serratia marcescens</i> 2170	cette étude
pBAD ::SmarA'	Amp	<i>mntIA'</i> <i>Serratia marcescens</i> 2170	cette étude
pBAD ::BfraB	Amp	<i>mntI</i> <i>Bacteroides fragilis</i> 25285D	cette étude
pBAD ::CtepB	Amp	<i>mntI</i> <i>Chlorobium tepidum</i> 49652D	(Richer, Courville et al. 2003)
pBAD ::CtepB H214A	Amp	<i>mntI</i> <i>Chlorobium tepidum</i> muté	cette étude
pBAD ::CtepB H214R	Amp	<i>mntI</i> <i>Chlorobium tepidum</i> muté	cette étude
pBAD ::XcamCu	Amp	<i>mntI</i> <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> 33913	cette étude
pBAD ::XcamCu H238A	Amp	<i>mntI</i> <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> muté	cette étude
pBAD ::XcamCu H238R	Amp	<i>mntI</i> <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i> muté	cette étude
pBAD ::NpunCu	Amp	<i>mntI</i> <i>Nostoc punctiforme</i> 29133D	cette étude
pBAD ::WbreCβ	Amp	<i>mntI</i> <i>Wigglesworthia brevialpilis</i>	cette étude
pBAD ::SmutCβ	Amp	<i>mntI</i> <i>Streptococcus mutans</i> 25175D	cette étude
pBAD ::PfluCy	Amp	<i>mntI</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25.	cette étude
pGBM6-pH	SmR	GFP ratiométrique (gene bank AF058694)	(Courville, Chaloupka et al. 2004)
pKO3	CmR		(Link, Phillips et al. 1997)
pKO35'Km3'	CmR, KmR		cette étude
pKO35'Styp3'	CmR		cette étude
pKO35'Echry3'	CmR	<i>mntI</i> sous contrôle du promoteur de <i>S. Typhimurium</i>	cette étude
pKO35'SmarA'3'	CmR		cette étude
pKO35'XcamCu3'	CmR		cette étude
pKO35'SmutCβ3'	CmR		cette étude
pK18mobsacB	KmR		
pK18 <i>mntI</i> ( <i>Tet</i> )	KmR, TetR		cette étude
pK18 <i>mntR-mntI</i> ( <i>Gm</i> )	KmR, GmR		cette étude
pK18 <i>mntR</i> ( <i>Sm</i> )	KmR, SmR		cette étude
pK18comp		<i>cumB-mntR-mntI</i>	cette étude
pBBR1-Tp	TpR		(Kovach, Elzer et al. 1995)
pBBR1-Tet	TetR		cette étude
pBBR1-Km	KmR		cette étude
pBBR1-Sm	SmR		cette étude
pCRH	TetR	<i>cumB-mntR-mntI</i>	cette étude



### 3.2.3 Électrophorèse des fragments d'ADN

En fonction du nombre d'échantillons, deux types de cuves à électrophorèse ont été utilisés. La première, plus petite, est le modèle « Owl EasyCast™ Minigel system » (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH). La seconde est le modèle « D4 Hippo™ Electrophoresis System » (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH). Les gels d'agarose ont été produits à partir d'agarose (0,8 à 1,2 % final) dissout dans 40 ml ou 100 ml de tampon Tris-Borate-EDTA (TBE). La migration s'est effectuée dans le même tampon à un voltage variant de 80 à 150 V. Ensuite, le gel a été déposé dans une solution de bromure d'éthidium à  $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pendant environ 30 min. L'ADN a ensuite pu être visualisé et photographié, par exposition au rayonnement UV, à l'aide du BIO-RAD Gel Doc 1000 » (Biorad Laboratory, Hercules, CA).

### 3.2.4 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les réactions de polymérisations en chaîne (PCR), pour l'amplification de fragments d'ADN à des fins de vérification, ont été effectuées avec la polymérase *Taq* (Invitrogen). Deux protocoles faisant intervenir cette enzyme ont été utilisés (Bergevin 2003). Le premier est appelé PCR sur colonies. Le principe est de prélever directement une colonie isolée sur la gélose et de la mélanger à 100  $\mu\text{L}$  d'eau stérile. De ce mélange, 16,5  $\mu\text{L}$  ont été prélevés et un volume de 8,5  $\mu\text{L}$  de solution 1 a été ajouté, pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

Pour le second protocole utilisant cette enzyme, 1  $\mu\text{L}$  d'ADN plasmidique ( $1-5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) ou génomique (environ  $50 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), a été ajouté à 15,5  $\mu\text{L}$  d'eau milliQ stérile. Ensuite, un volume de 8,5  $\mu\text{L}$  de solution 1 a été ajouté pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

La solution 1 comprenait : 2,5  $\mu\text{L}$  de tampon *Taq* 10X (Gibco BRL), 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de dNTP (2,5  $\mu\text{M}$  de chaque nucléotide), 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM) (Gibco BRL), 1  $\mu\text{L}$  de chaque solution d'oligonucléotides à  $5 \text{ pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 1,9  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  milliQ stérile, et 0,1  $\mu\text{L}$  de polymérase *Taq*.

La polymérase *Pfu* a été utilisée lors de l'amplification de fragments d'ADN à des fins de clonage. Cette polymérase a l'avantage de faire moins d'erreurs. Les échantillons

comprenaient les réactifs suivants : 1  $\mu\text{L}$  d'ADN plasmidique (1-5  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) ou génomique (environ 50  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  de tampon *Pfu* (Stratagene), du  $\text{MgSO}_4$  (Gibco BRL, concentrations finales allant de 2 à 12 mM), 1  $\mu\text{L}$  d'une solution de dNTP (20  $\mu\text{M}$  de chaque nucléotide), 1  $\mu\text{L}$  de chaque solution d'oligonucléotides (5  $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), avec (1,15  $\mu\text{L}$ ) ou sans DMSO (100%) (tableau 4), 0,2  $\mu\text{L}$  de polymérase *Pfu* et enfin de l'eau milliQ stérile pour un volume final de 25  $\mu\text{L}$ .

Les échantillons ont été mis dans le thermocycleur « PTC-100<sup>TM</sup> programmable Thermal Controller » (MJ Research Inc., Watertown, MA), pour un minimum de 30 cycles d'amplification. Le tableau 3 présente les oligonucléotides utilisés et le tableau 4 résume les conditions utilisées pour les réactions de polymérisation en chaîne. Les différentes étapes ont fait intervenir une étape de dénaturation (5 min à 94 °C), suivie d'une série de 5 cycles : 45 s de dénaturation à 94 °C, 45 s d'hybridation à une température variable T1 (tableau 4), suivie d'une étape d'élongation durant un temps variable t (tableau 4) à une température de 72 °C. Ensuite les échantillons ont été soumis à une série de 25 cycles : 45 s de dénaturation à 94 °C, 45 s d'hybridation à une température variable T2 (tableau 4) et, une étape d'élongation durant un temps variable t (tableau 4) à une température de 72 °C. Enfin une dernière incubation de 10 min à 72 °C, a été ajoutée pour terminer les fragments incomplets.

En général les températures d'hybridation ont été calculées comme suit :

$$T1 = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{Nombre de G et C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{Nombre de A et T}) - [4^{\circ}\text{C} \times (\text{Nombre de G et C mutés}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{Nombre de A et T mutés})] - 5.$$

$$T2 = 4^{\circ}\text{C} \times (\text{Nombre de G et C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{Nombre de A et T}) - 5.$$

Cependant, pour des raisons d'efficacité, ces températures ont souvent été modifiées de manières empiriques. Elles sont présentées dans le tableau 4 pour chacune des PCR.

Le temps t d'élongation, présenté dans le tableau 4, a été calculé en fonction de la longueur du fragment à amplifier et de la vitesse de l'enzyme (*Taq* : 1 Kb par minute, *Pfu* : 0,5 Kb par minute).

**Tableau 3. Oligonucléotides utilisés.**

Oligonucléotide	Séquence de 5' vers 3'
XcampF	GCCCATGGCCAGCGAGATC
XcampR	CCCTCTAGACTCTCACCCCA
XcampR2	GCTTCTAGACCAACGCGAATTCCC
EchryF	CTCCCATGGCGGGGAGTCGT
EchryR	CAAGCTCTAGAATTAACCCAGCA
EchryR2	ACATCTAGACCAGCAGCGTATCCAG
KanaF	AAAAGCCATGGTGTGTCTCAAAATC
KanaR	GCCCTCTAGAAGAAGGTGTTGCT
5'StvpF	TTGCTGCAGCGGCCCGGTGTACAT
5'StvpR	AAAACCATGGCCTTTGCTATGTTTCAT
5'StvpR2	CAGCCATGGTTTGCCTCAAAAAATAG
3'StvpF	TGTTCTAGAGACAGAAAGATAGCAGGC
3'StvpR	GCTGGTACCGCGGCCGAGGAAAAA
SmarA'F	GTACTTCATGAGAGACCGGCAAC
SmarA'R	GCGTTC TAGACTAACCAGGGATATC
SmarAF	CAACTCATGACGAAACAGTCGCGTGG
SmarAR	TTTGICTAGAGCACGCTGCCGATC
PfluF	CCCCATGGAAATTCAGCCTGCCAAAAAT
PfluR	TCGTCTAGAACACCCACTGGCCAAAT
StyNCO	AAACCATGGCTGACAAATCGCGT
StvpR2	GTCTCTAGAACAAACCCATCACCG
Gratio2F	AAAAAGCATGCGTAAAGGAGAAGAACT
Gratio2R	TATTAAGCTTTTATTTGTATAGTTCATCC
SmutF	TCACCATGGGAAAACTCATCCAAAA
SmutR2	AAGGTACCGCAATTGACATTGATTC
XcaHindIII	CGCAAGCTTTGTCTGCCATATCAC
XcaNoMutR	ACACCAACACCACGTCCAGCG
XcaSmallF	TTACCCGG GCGGCATCAACC TG
XcaBspHIR	TGGTCTATGAGCGGGCGAAAAAGAC
pBAD245	CTGTTTCTCCATACCCGTT
pBAD2432	GGCTGAAAAATCTTCTCT
CKO3	AGGGCAGGGTCGTTAAATAGC
EKO3	TTAATGCGCCGCTACAGGGCG
EcoH216AF	CATGTGATTTATTTGGCGTCTCGCTCACTC
EcoH216AR	GAGTGAGCGAGGACGCCAAAATAAATCACATG
EcoH216RF	CATGTGATTTATTTGAGGTCCTCGCTCACTC
EcoH216RR	GAGTGAGCGAGGACCTCAAATAAATCACATG
CteH214AF	CAACGTGTATCTGGCGTCCAAACGTCATTAC
CteH214AR	GTGAATGACGTTGGACGCCAGATACACGTTG
CteH214AF	CAACGTGTATCTGAGATCCAAACGTCATTAC
CteH214AR	GTGAATGACGTTGGATCTCAGATACACGTTG
XH238AF	CATAACCTGTATCTGGCGTCTCGATCGTGC
XH238AR	GCACGATCGACGACGCCAGATACAGGTTATG
XH238RF	CATAACCTGTATCTGAGATCGTCTCGATCGTGC
XH238RR	GCACGATCGACGATCTCAGATACAGGTTATG

**Tableau 4. Conditions expérimentales de toutes les réactions de polymérisations en chaîne.**

Nom	Oligo.	T1	T2	t	Conditions	Polymérase	À partir de
Xcamp	XcampF XcampR	58	64	3	4, 6, sans DMSO et 4,6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
Echry	EchryF EchryR	51	61	3	4 sans DMSO et 4,6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
Kana	KanaF KanaR	57	58	2,30	4, 6 et 8 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	P34S-Km
5'Styp	5'StypF 5'StypR	52	64	2,30	4,6 sans DMSO et 6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
5'Styp2	5'StypF 5'StypR2	52	62	2,30	6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
3'Styp	3'StypF 3'StypR	50	65	2,30	4, 6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	Prod PCR
SmarA'	SmarA'F SmarA'R	59	65	3,15	6, 8 et 12 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
SmarA	SmarAF SmarAR	59	65	3	4, 6 et 8 mM de MgSO <sub>4</sub> avec et sans DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
Pflu	PfluF PfluR	58	66	3	6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
Smut2	SmutF SmutR2	55	61	3	6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec et sans DMSO	<i>Pfu</i>	pBS :: Smut
Echry2	EchryF EchryR2	51	62	3	4, 6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec et sans DMSO	<i>Pfu</i>	pBAD :: EchryA
Styp2	StyNCO StypR2	51	62	3	4, 6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec et sans DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
Xcamp2	XcampF XcampR2	51	61	3	4, 6,8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec et sans DMSO	<i>Pfu</i>	pBAD::XcamC
XcaPCR1	XcaSmaIF et XcampR2	50	64	3	4, 6, 8 et 10 mM de MgSO <sub>4</sub> avec ou sans DMSO	<i>Pfu</i>	pBAD::XcamC
XcaPCR2	XcaHindIIIIF XcaNoMutR	58	64	4	4, 6, 8 mM de MgSO <sub>4</sub> + DMSO	<i>Pfu</i>	ADNg
Gratio2	Gratio2F Gratio2R	55	62	2,30	6, 8, 10 et 12 sans DMSO et 8, 10 et 12 mM de MgSO <sub>4</sub> avec DMSO	<i>Pfu</i>	pMG36-GFPratio
V5'styp2	5'StypF 5'StypR2	52	52	2	30 cycles	<i>Taq</i>	Colonies
VRH	XcaHindIIIIF XcaNoMutR	50	64	2	32 cycles	<i>Taq</i>	Colonies
pBAD24	pBAD245 pBAD2432	48	48	variable	32 cycles	<i>Taq</i>	Colonies
pKO3	CKO3 EKO33	52	52	4	35 cycles	<i>Taq</i>	Colonies

### 3.2.5 Purification des fragments d'ADN

La purification des fragments d'ADN a été effectuée à l'aide des trousse provenant de la compagnie Qiagen (Mississauga, ON). La trousse « Qiaquick PCR purification kit » a été utilisée lors de la purification des produits de la PCR. La trousse « QIAquick Gel extraction kit » a été utilisée lors de la purification de fragments après une digestion enzymatique ou lorsque les produit de la PCR comprenaient des fragments amplifiés de manière non spécifique. Le protocole de cette trousse utilise le même principe que les autres cependant, les fragments d'ADN ont subit une migration préalable dans un gel d'agarose. Les fragments d'ADN, après coloration, ont été excisés du reste du gel, puis purifiés. La trousse « QIAquick Removal Nucleotids Kit » a été utilisée lors de la purification des sondes ADN marquées au  $^{32}\text{P}$ . Toutes ces trousse ont été utilisées en accord avec les recommandations du manufacturier, sans aucune modification.

### 3.2.6 Extraction d'ADN génomique

L'extraction des ADN génomiques a été effectuée sur différentes souches bactériennes (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *X. campestris*, *S. marscescens*). Le protocole utilisé est le même pour toutes les souches. Ce protocole a déjà été décrit (Makui, Roig et al. 2000; Richer, Courville et al. 2003) mais il a été modifié pour de meilleurs rendements.

La première étape consiste à mettre en culture les bactéries, à partir d'une colonie isolée, dans 25 ml milieu de culture riche (Milieu LB pour *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. marscescens* et milieu TYG pour les souches de *X. campestris*) avec antibiotiques, jusqu'à la phase stationnaire. De ces cultures, 5 ml ont été déposés dans des tubes de 13 ml et centrifugés à 4150 RPM à l'aide de la centrifugeuse « Sorval Legend<sup>TM</sup> RT » (Kendro Laboratory Products, Newtown, CT). Le surnageant a été enlevé par inversion puis par aspiration pour ôter le maximum de milieu. Le culot bactérien a été dispersé dans 2,835 ml de tampon TE (10 mM Tris.Cl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8), jusqu'à homogénéisation complète. Il a été ensuite ajouté 150  $\mu\text{L}$  de sodium dodecyl sulphate (SDS) 10 % et 15  $\mu\text{L}$  d'une solution de protéinase K (Roche Diagnostics) à 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Cette étape, dénaturant les protéines, permet la destruction des membranes bactériennes. La solution, devenue blanchâtre, a été mise 5 min à température pièce, dans un rotateur LABQUAKE® (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, Iowa) et 30 min à 50 °C. Passé ce délai, les étapes d'ajout de SDS et de protéinase K, de rotation douce et d'incubation ont été effectuées à nouveau. Il a été ajouté ensuite, 500 µl de NaCl 5 M préchauffés à 65 °C. Le mélange a été agité doucement à l'aide du rotateur durant 5 min à température ambiante. Puis, 400 µl de CTAB/NaCl préchauffés à 65 °C ont été ajoutés. Le mélange a été mis en rotation 5 min pour être ensuite incubé 10 min à 65 °C.

L'ADN a été débarrassé de ses contaminations en rajoutant 4 ml d'une solution de chloroforme-alcool isoamyl (ratio 24 :1). Les tubes ont été déposés sur le rotateur jusqu'à l'obtention d'une émulsion fine soit, au minimum, 1 h 30. Les tubes ont été centrifugés durant 10 min à 10000 RPM à l'aide d'adaptateurs et du rotor JA-17 des centrifugeuses Beckman J-21B ou J2-21M (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). La phase aqueuse a été déposée dans un nouveau tube propre. À cette solution, il a été ajouté un volume égal (environ 3,750 ml) d'une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamyl (ratio 25 :24 :1). Les tubes ont été mis sur le rotateur 5 min et le tout a été centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. De la même façon, la phase aqueuse a été prélevée et les mêmes étapes [volume égal phénol-chloroforme-isoamyl alcool (ratio 25 :24 :1), rotation, centrifugation, prélèvement de la phase aqueuse] ont été renouvelées. À cette nouvelle phase aqueuse, il a été ajouté 0,6 volume d'isopropanol. La solution a été mélangée par inversion douce jusqu'à l'apparition d'un filament d'ADN visible à l'œil nu. La majorité du liquide (sans l'ADN) a été ensuite ôtée par inversion et par aspiration jusqu'à laisser l'ADN dans environ 500 µl. Ce volume et l'ADN ont été ensuite transférés, par inversion, dans un tube Eppendorf propre. Sans toucher au précipité d'ADN, le maximum de liquide a été ôté et 1ml d'éthanol 75 % a été ajouté pour laver l'ADN. Le tout a été mélangé par inversion douce. Cette étape de lavage a été, à nouveau, répétée et tout l'éthanol a été éliminé par aspiration puis séché durant 1 ou 2 min. L'ADN obtenu a été dissout dans un volume d'eau ou de tampon TE, allant de 20 µL à 200 µL (en général 100 µL), suivant l'utilisation et la concentration désirée. Les tubes ont été deux fois incubés à 65 °C durant 15 min et 4 °C durant 5 min cela, dans le but de bien dissoudre

l'ADN. Les échantillons ont été traités avec de la RNase A (Roche Diagnostics) à une concentration finale de  $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , durant 30 min à  $37^\circ\text{C}$  et ont été entreposés à  $4^\circ\text{C}$ .

### 3.2.7 Préparation des sondes par marquage radioactif à l'aide du $^{32}\text{P}$

Deux méthodes ont été utilisées pour le marquage radioactif de sondes, suivant la disponibilité de la source de  $^{32}\text{P}$ .

La première (Richer 2005), moins efficace et utilisée pour le marquage des oligonucléotides, fait intervenir l'enzyme T4-polynucléotide kinase (T4-PNK, NEB). Brièvement,  $2 \mu\text{L}$  de tampon T4 PNK 5X,  $2 \mu\text{L}$  de  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  ( $10 \mu\text{Ci}.\mu\text{L}^{-1}$ ) (Amersham Biosciences), et  $2 \mu\text{L}$  de T4 PNK ( $10\,000 \text{ unités}.\text{ml}^{-1}$ ) ont été ajoutés à  $6 \mu\text{L}$  d'ADN (20 à 200 ng). La sonde a été incubée à  $37^\circ\text{C}$  durant 3-4h.

La seconde méthode (Makui, Roig et al. 2000; Bergevin 2003) fait intervenir l'enzyme « DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment» (NEB). Dans un tube à capuchon vissable, l'ADN (20 à 200ng dans un volume final de  $30 \mu\text{L}$ ) a été mis à  $100^\circ\text{C}$  durant 5 minutes. Ensuite, ces  $30 \mu\text{L}$  ont été placés dans un tube contenant :  $2 \mu\text{L}$  de BSA 100X (NEB),  $10 \mu\text{L}$  d'OLB 5X, et  $7 \mu\text{L}$  de  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  ( $10 \mu\text{Ci}.\mu\text{L}^{-1}$ ) (Amersham Biosciences). Après l'ajout de  $0,5 \mu\text{L}$  de Klenow ( $5\,000 \text{ unités}.\text{ml}^{-1}$ ), le tube a été incubé à température ambiante durant 3-4 h. L'OLB 5X, conservé à  $-20^\circ\text{C}$ , est composé de :

- $100 \mu\text{L}$  de solution A : [1ml d'une solution 0 (1,25 M Tris, 0,125 M de  $\text{MgCl}_2$  pH 8,0),  $18 \mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoéthanol, et  $5 \mu\text{L}$  de solution à 100 mM de chaque dNTP sauf le dCTP]
- $250 \mu\text{L}$  de solution B : [2 M Hepes pH 6,6]
- $250 \mu\text{L}$  de solution C : [Solution d'hexamères aléatoires à  $90 \text{ unités}.\text{ml}^{-1}$  (Amersham Pharmacia Biotech)].

Après l'incorporation de la radioactivité, les sondes ont été purifiées en utilisant la trousse « QIAquick Removal Nucleotides Kit » de la compagnie Qiagen (Mississauga, ON). Le protocole a été effectué conformément aux instructions du manufacturier et les ADN ont été dissous dans un volume final de  $200 \mu\text{L}$ . La quantité de radioactivité a été déterminée en déposant  $2 \mu\text{L}$  de solution contenant la sonde, dans un tube contenant 2 ml de liquide à scintillation, à l'aide du compteur à scintillation « Beckmam LS 1701 Liquid

Scintillation System » (Beckman Instruments-Nuclear Systems Operations, Fullerton, CA).

### 3.2.8 Buvardage de type Southern

Le protocole a déjà été décrit (J. Sambrook 1989; Makui, Roig et al. 2000) cependant, certaines modifications ont été apportées.

L'ADN génomique a été digéré durant 16h à 37°C en général, dans un volume final de 10 µL. Celui-ci comprenait les réactifs suivants : 7 µL (avec 1 µL de BSA 10X) ou 8 µL d'ADN génomique, 1 µL de tampon de digestion 10X (NEB), et 1 µL d'enzyme (5 à 20 unités). La digestion, sans purification, a ensuite été déposée dans un gel d'agarose 1 %, et la migration a été effectuée à 90 V durant environ 2-3 h. Le gel a été incubé ensuite dans une solution de bromure d'éthidium puis photographié. Tel que décrit dans le manuel « GeneScreen Plus NEF\_976 » (NEN Life Science Products, Boston, MA), le gel a été déposé dans des bains successifs, 10 min dans du HCl 0,25 N, 4 fois dans de l'eau milliQ durant 3 min, 2 fois 15 min dans un bain d'une solution de dénaturation (0,6 M NaCl, 0,4 N NaOH), 2 fois 15 min dans un bain de solution de neutralisation (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5). Les échantillons ont été transférés par capillarité sur une membrane de nylon « GeneScreen Plus NEF\_976 » (NEN Life Science Products, Boston, MA), à l'aide du «Life Technologie™, Blot Transfert System 11.14» (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) contenant une solution de SSC 10X pH 7 (1,5 M NaCl, 0,15 M de citrate de sodium), pendant une période d'au moins 36 h. La membrane a ensuite été déposée par le côté opposé à l'ADN, durant quelques secondes, dans 2 mL de solution de dénaturation sur un papier paraffine. La même chose a été faite avec 2 ml de la solution de neutralisation. Puis la membrane a été baignée dans du SSC 10X et elle a été déposée sur du papier cellophane. Par la suite, elle a été traitée aux rayons UV, à une dose de 150 mJ, à l'aide du « BIO-RAD GS Gene Linker™ UV Chamber » (Bio-rad Laboratories, Richmond, CA). Enfin, la membrane a été déposée sur un papier buvard et cuite à 80°C pendant 2-3h.

La membrane a été déposée dans un tube à hybridation préchauffé à 65°C, la face ADN tournée vers l'intérieur du tube, et 5 ml de solution de pré-hybridation préchauffée à 65°C ont été ajoutés. La solution de pré-hybridation contenait : 16,29 mL d'H<sub>2</sub>O MilliQ



stérile, 6 mL de « Blocking Reagent » (Roche cat N° 1096 176), 7,5 mL de SSC 20X, 150  $\mu$ L de Lauryl-sarkosyl 20 %, 60  $\mu$ L de SDS 10 %. Le tube a été mis en rotation, dans le four à hybridation « Hybridation Incubator model 310 » (Robbins Scientifics Corporation, Sunnyvale, CA), préchauffé à 65°C, durant 5 min, dans le but de rincer le tube. Ensuite, la solution a été ôtée et remplacée par 10 ml de solution de pré-hybridation préchauffée à 65°C. Le tube a été mis en rotation, dans le four à hybridation, durant 2 h. La sonde radioactive, bouillie durant 10 minutes, a été ajoutée à 10 ml de la solution de pré-hybridation conservée à 65°C (à une concentration finale 2 millions CPM.ml<sup>-1</sup>). Le tube a été vidé de la solution de pré-hybridation et les 10 ml de la solution contenant la sonde radioactive ont été ajoutés. Le tube a été mis en rotation dans le four à hybridation à 65°C durant environ 16h. Passé ce délai, les tubes ont été vidés de leur contenu et les membranes ont subi les lavages suivants : deux fois 15 à 30 min avec environ 150 ml de solution 1 (SSC 1X + SDS 0,1 % + 0,02 % Lauryl Sarcosyl) préchauffée à 65°C et deux fois 15 à 30 min avec environ 150 ml de solution 2 (SSC 0,1 X + SDS 0,1 % + 0,02 % Lauryl Sarcosyl) préchauffée à 65°C. Ces étapes se sont faites dans les tubes placés au four à 65 °C avec rotation. La membrane a été sortie du tube à l'aide de pinces et enveloppée de papier cellophane.

La membrane a été placée dans une cassette « Spectroline » (Spectronics Corporation, Westbury, NY), et exposée sur film « Kodak Scientific Imaging » (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) et le tout a été placé à -70°C pour un minimum de 24h. Le film a été développé à l'aide du « Mini-Med/90 X-ray Film processor » (AFP Imaging Corp, Elmsford, NY). Alternativement, la membrane a été placée dans une cassette « Storage Phosphor Screen » (Molecular Dynamics) et, après une exposition de 30 min à 16 h, la cassette a été développée à l'aide du « PhosphorImager SI » (Molecular Dynamics).

### **3.2.9 Préparation de bactéries compétentes et transformation**

Deux protocoles sont couramment utilisés dans le laboratoire pour la transformation de bactéries à l'aide de plasmide (Bergevin 2003). Le premier fait subir un choc chimique aux bactéries (Chung, Niemela et al. 1989) et est plus rapide. Il a été

utilisé lors de la transformation de plasmides purifiés et en quantité suffisante. Le second, plus efficace mais plus long dans la préparation des cellules (Cell-Porator™ Voltage Booster Users Manual, Life Technologies, Cat.Series 1612), a été utilisé lorsque les quantités d'ADN étaient faibles, comme lors des clonages. Celui-ci fait subir un choc électrique aux bactéries. Un troisième protocole de transformation, à l'aide d'un choc thermique, a été utilisé dans la cadre du projet de mutagenèse dirigée, tel que décrit dans la trousse « QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagene).

### 3.3 Construction des plasmides pBAD ::MntH

Le plasmide pBAD24 est un vecteur d'expression et contient un promoteur inductible à l'arabinose (Guzman, Belin et al. 1995). Il a été choisi pour cloner le gène *mntH* de *E. coli* et de ses homologues car il est strictement régulé et ne montre pas de fuite d'expression en absence d'inducteur (Makui, Roig et al. 2000). De plus, pBAD24 contient un site *NcoI* avec un motif ATG qui peut être utilisé pour une production optimale de protéines (Siegele et Hu 1997). Les sites de restriction *NcoI* a été utilisé car il contient le codon ATG et, les motifs digérés par *NcoI* ou *BspHI* peuvent être liés ensemble. Dans le texte qui suit, le plasmide pBAD :: MntH est le nom général qui sera donné pour représenter tous les plasmides pBAD codant pour différentes protéines MntH.

Les cadres de lecture de *mntH* de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* souche 33913 (gracieuseté de : Dre V. Toussaint, Centre de Recherche et de Développement en Horticulture, Agriculture et Agroalimentaire Canada, QC, Canada), *Erwinia chrysanthemi* souche 3937 (ADN génomique gracieuseté de Dre D. Expert, Institut National Agronomique Paris-Grignon, France), *S. Typhimurium* isolat Keller et *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (Dr. P. Rainey, University of Oxford, United Kingdom) ont été amplifiés à l'aide, respectivement des PCR Xcamp, Echry, Styp et Pflu (tableau 4) à partir d'ADN génomiques. Les produits purifiés ont été digérés par *NcoI-XbaI* et liés avec pBAD24 digéré par les mêmes enzymes pour donner respectivement pBAD ::XcamCa, pBAD ::EchrA, pBAD ::StypA et pBAD ::PfluCγ.

Les cadres de lecture des gènes *mntH* de *Wigglesworthia brevipalpis* (ADN génomique gracieuseté de Dr Serap Aksoy, Department of Epidemiology and Public

Health, Yale University School of Medicine, USA), *Nostoc punctiforme*, *Streptococcus mutans* et *Bacteroides fragilis* (ADN génomique ATCC), ont été obtenus par digestion *NcoI-KpnI* des plasmides pBS5'*mntH* :: Npunc, pBS5'*mntH* :: Wiggle, pBS5'*mntH* :: Smut, et pBS5'*mntH* :: Bfrag, produits par Etienne Richer. Les produits de digestion ont été liés à pBAD24 digéré par *NcoI-KpnI*, pour donner respectivement les plasmides pBAD :: NpunC $\alpha$ , pBAD :: WbreC $\beta$ , pBAD :: SmutC $\beta$ , et pBAD :: BfragB.

Les cadres de lecture des deux gènes *mntH* de *Serratia marcescens* (Dr H. W. Ackermann, Université Laval, QC, Canada) ont été amplifiés à l'aide des PCR SmarA et SmarA', à partir du même ADN génomique. Les produits de PCR ont été digérés par *BspHI-XbaI* et liés avec pBAD24, digéré par *NcoI-XbaI*, pour donner respectivement les plasmides pBAD :: SmarA, pBAD :: SmarA'.

Les plasmides pBAD :: CtepB (Richer, Courville et al. 2003) et pBAD EcolA D34G (Chaloupka, Courville et al. 2005), étaient déjà disponibles dans le laboratoire de même que pBAD NX1.1 (renommé pBAD :: EcolA) (Makui, Roig et al. 2000).

Tous les cadres de lectures ont été séquencés et aucune différence n'a été observé en comparaison avec les séquences des souches dont le génome a été séquencé (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>), sauf dans le cas de :

EchrA : V<sub>3937TIGR329I3937Expert</sub> = T<sub>EcolA329</sub>

SmarA : T<sub>db119P2170</sub> = S<sub>EcolA9</sub>, P11S = G11, I127V = V126, R156L = K155, F180L = L179, V223I = H222, Q286H = H285, H320R = R319

SmarA' : V<sub>db11418G2170</sub> = I<sub>EcolA402</sub>

### 3.4 Mutagenèse dirigée des protéines EcolA, CtepB, et XcamC $\alpha$

Tel que décrit dans (Chaloupka, Courville et al. 2005), plusieurs autres plasmides ont été produits. Ceux-ci codent pour des protéines MntH ayant une mutation sur l'histidine qui se trouve en position 216 pour la protéine EcolA, en position 214 pour CtepB, et 238 pour XcamC $\alpha$ . Ces mutations ont été effectuées à l'aide de la trousse « QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit » (Stratagene). Les oligonucléotides ont été conçus à l'aide du site <http://labtools.stratagene.com/QC/>. Toutes les étapes de

mutagenèse ont été effectuées conformément aux instructions du fabricant. Cependant, les quantités de réactifs, lors de la réaction de polymérisation, ont été divisées par 2,5. Les réactifs suivants ont été ajoutés : 2 µL de tampon 10X fourni, 0,4 µL d'ADN (2 à 20 ng), 0,4 µL de chaque solution d'oligonucléotides à 125 ng.µL<sup>-1</sup>, 0,4 µL d'une solution de dNTP fournie, et 16,4 µL d'H<sub>2</sub>O pour un volume total de 20 µL. Les échantillons ont ensuite été déposés dans le thermocycleur. Dans tous les cas, les paramètres utilisés ont été de 30 secondes de dénaturation à 95 °C, suivi de 17 cycles : 30 s de dénaturation à 95 °C, 30 s d'hybridation à 55 °C et 6 min d'élongation à 68 °C. Les échantillons ont ensuite été traités pendant une heure à 37 °C, avec 1 µL de l'enzyme de restriction *DpnI*. Le but de cette étape est d'éliminer les plasmides parents méthylés. Ensuite, les plasmides ont été introduits par choc thermique, dans les souches *E. coli* XLI-Blue fournies, comme indiqué par le fabricant.

Les plasmides pBAD ::EcoI H216A et pBAD :: EcoI H216R ont été construits à partir de pBAD.NX1.1 à l'aide, respectivement, des couples d'oligonucléotides EcoH216AF-EcoH216AR et EcoH216RF-EcoH216RR (tableau 3). Les plasmides pBAD :: XcaI H238A et pBAD :: XcaI H238R ont été construits à partir de pBAD ::XcaI à l'aide, respectivement, des couples d'oligonucléotides XcaH238AF-XcaH238AR et XcaH238RF-XcaH238RR (tableau 3). Et enfin, les plasmides pBAD ::CteI H214A et pBAD ::CteI H214R, ont été construits à partir de pBAD ::CteI à l'aide, respectivement, des couples d'oligonucléotides CteH214AF-CteH214AR et CteH214RF-CteH214RR (tableau 3). Les mutations ont été vérifiées par digestion. En effet, l'introduction de la mutation faisait apparaître ou disparaître un site de restriction. De plus les cadres de lecture des plasmides pBAD ::EcoI H216A et pBAD :: EcoI H216R, ont été séquencés.

### 3.5 Marquage métabolique des homologues MntH à l'aide de [<sup>35</sup>S]-Méthionine

Le marquage métabolique des homologues a été effectué tel que précédemment décrit (Makui, Roig et al. 2000) cependant, certaines modifications ont été apportées. Les différentes souches de *E. coli* DH11S *mntH* portant l'un des plasmides pBAD ::MntH, ont été mises en culture dans 3 ml de milieu LB supplémentés d'antibiotiques (Amp, Km).

Celles-ci ont été incubées durant 16 h à 37 °C et à 250 RPM. Après cette incubation, les  $DO_{600}$  ont été mesurées en diluant les cultures au dixième et 1 ml de chaque culture a été centrifugé 1 min à 8000 RPM. Après avoir enlevé le surnageant, le culot bactérien a été lavé en le dispersant dans 1 ml de milieu minimal (G/M, pH 7 incomplet) et en centrifugeant 1 min à 8000 RPM. Le nouveau culot a été dispersé dans 1 ml de milieu G/M incomplet. Cette solution a servi à ensemercer 3 ml de milieu minimal incomplet préchauffés à 37 °C de manière à obtenir une  $DO_{600}$  finale de 0,6 (facteur de dilution =  $DO_{600 \text{ init}}/0,6$ ). Cette culture a été incubée durant 3-4 h à 37 °C à 250 RPM. À la fin de cette incubation, les  $DO_{600}$  ont été mesurées en diluant chaque culture au dixième et les densités optiques ont été ajustées de manière à obtenir 2,4 ml de culture à une  $DO_{600}$  de 0,6 (normalement les cultures étaient déjà à 0,6 car il n'y a pas vraiment de croissance dans le milieu G/M incomplet). Ces 2,4 ml ont été centrifugés 1 min à 8000 RPM. Le surnageant a été enlevé par aspiration et dispersé dans 1,2 ml de milieu G/M incomplet. De cette solution, 1 ml a été transvasé dans un tube de culture et mis dans la glace jusqu'à l'induction. Les échantillons ont ensuite subi différents traitements. Le premier a été un préchauffage de 3 min à 37°C. Le second a été l'induction du gène *mntH*, en rajoutant 1 ml de milieu G/M incomplet, avec 0,4 % arabinose, préchauffé à 37°C. Les tubes ont été incubés à 37°C durant 5 min et cette incubation a été suivie d'une étape de marquage radioactif en rajoutant 500 µL d'une solution de  $^{35}\text{S}$  L-méthionine (Amersham Biosciences) à  $0,04 \mu\text{Ci} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , supplémentée d'arabinose à 0,4 % et préchauffée à 37 °C. Les tubes ont été incubés à 37 °C durant 30 min. La dernière étape a été la chasse, en rajoutant 500 µL d'une solution de L-méthionine, à 0,2 % et non radioactive, supplémentée de 0,4 % d'arabinose et préchauffée à 37 °C. Les tubes ont été incubés à 37 °C et, aux temps indiqués sur la figure 7, 300 µL ont été prélevés, mis dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et déposés immédiatement dans la glace. Ces tubes ont été centrifugés 2 min à 13000 RPM et le surnageant a été ôté délicatement par aspiration. Le culot a été mélangé à 21,4 µL de tampon de lyse et 2 µL ont été prélevés pour la mesure de radioactivité. Les tubes ont été stockés immédiatement à - 70°C. Le tampon de lyse était composé d'une gélule de « Complete Mini EDTA-Free Protease Inhibitor» (Roche Molecular Biochemicals) dissoute dans 8 ml d'une solution de « 1X Sample Buffer (SDS

reducing) » (0,0625 M Tris-HCl pH 7,2, SDS 2 %, glycérol 10 %, 2-β-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol 0,125 %).

La quantité de radioactivité (seulement pour le temps  $t=0$ ) a été déterminée en déposant les 2  $\mu\text{L}$  des échantillons dans un tube contenant 2 ml de liquide à scintillation, à l'aide du compteur à scintillation « Beckmam LS 1701 Liquid Scintillation System » (Beckmam Instruments-Nuclear Systems Operations, Fullerton, CA).

Les échantillons ont été analysés à l'aide de gel SDS-Page, tel que décrit précédemment (J. Sambrook 1989; Makui, Roig et al. 2000). Les gels de séparation utilisés avaient une concentration d'acrylamide de 12 %, et étaient composés de 6,7 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, 5 ml de Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 200  $\mu\text{L}$  de SDS 10 %, 8 ml d'une solution à 30 % d'acrylamide/bis, 100  $\mu\text{L}$  d'ammonium persulfate (APS) 10% préparés fraîchement, et de 10  $\mu\text{L}$  de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylethylène diamine). Le gel de compaction était, quant à lui, constitué de 12,2 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ, 5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 200  $\mu\text{L}$  de SDS 10 %, 2,6 ml d'une solution à 30 % d'acrylamide/bis, 100  $\mu\text{L}$  d'APS 10 %, et de 10  $\mu\text{L}$  de TEMED. À chaque expérience, la mesure de la radioactivité des échantillons à  $t=0$ , a permis d'homogénéiser le nombre de CPM par puits et, en moyenne,  $3 \cdot 10^6$  CPM ont été déposés dans chaque puits. Les protéines ont ensuite migré à l'aide de l'électrophorèse « Mini PROTEAN® 3 Cell » (Bio-Rad) remplie de tampon d'électrode 1X pH 8,3 (dilution d'une solution 5X : Tris 15  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , glycine 72  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , SDS 5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Après la migration, les gels ont baigné durant 40 min, dans une solution de méthanol 40 %, acide acétique 10 %, et ont été séchés sur papier buvard, durant 1 h 30 à 80 °C, à l'aide de l'appareil « Slab Dryer Model 483 » (Bio-Rad).

Les gels ont été exposés et développés de la même façon que lors du buvardage de type Southern (section 3.2.8).

### 3.6 Construction du plasmide pGBM6-pH et mesure du transport de protons dépendant des homologues

Durant cette étude, un plasmide exprimant une GFP ratiométrique a été construit. Les étapes de construction ainsi que le protocole de mesure du transport de protons par les protéines MntH, sont décrits dans l'article suivant (Courville, Chaloupka et al. 2004). Brièvement, la GFP ratiométrique a été amplifiée du plasmide pGFPratiometric (Olsen, Budde et al. 2002), à l'aide du couple d'oligonucléotides Gratio2F-Gratio2R (tableau 3) et de la PCR Gratio2 (tableau 4). Après digestion par *SphI* et *HindIII*, le fragment a été cloné dans pJBA111 (Andersen, Sternberg et al. 1998). La cassette, P<sub>Λ1/04/03</sub>-RBSII-gfp ratio-T0-T1, a été extraite de ce plasmide en utilisant les sites *NotI* et, des bouts francs ont été générés, dans le but de lier ce fragment à pGBM6 digéré par *SmaI*. Le plasmide ainsi produit a été appelé pGBM6-pH. Ce plasmide a été introduit dans la souche *E. coli* DH11S *mntH*, par électroporation. Et, par la suite, les différents plasmides pBAD ::MntH ont été introduits dans ces bactéries, par la méthode de transformation chimique TSS.

Le protocole utilisé pour mesurer le transport de protons a déjà été décrit (Courville, Chaloupka et al. 2004). Après une induction des homologues, durant 1 h à l'aide de 0.06 % d'arabinose, les bactéries ont été lavées avec 1 ml de tampon citrate-potassium phosphate (50 mM, pH 5) et resuspendues dans ce même tampon, de façon à obtenir une culture possédant une DO<sub>600</sub> de 0,2. Par la suite, la fluorescence a été mesurée à l'aide du «Cary Eclipse fluorescence spectro-photometer» (VARIAN, Inc.). Les paramètres d'excitation utilisés ont été de 410 et 470 nm et l'émission a été détectée à 520 nm. Préalablement, une courbe de calibration a été produite dans le but de convertir le ratio d'excitation R, à t = 500 s (410/470 nm), en concentration intracellulaire de protons.

### 3.7 Construction d'un mutant *S. Typhimurium* *mntH* ::Km, *sitA* ::Sm (M2S)

Les travaux d'Elise Boyer l'ont amené à créer un certain nombre de mutants *S. Typhimurium* (Boyer, Bergevin et al. 2002) dont le double mutant *mntH* ::Cm, *sitA-D* ::Sm, ainsi que les simples mutants *sitA-D* ::Sm et *mntH* ::Cm. Le but final de l'étude des homologues, est de les insérer dans le génome de *S. Typhimurium* *sitA-D* ::Sm, à la

place de *mntH*, sous contrôle du promoteur natif du gène *mntH* de *S. Typhimurium*. Le plasmide suicide pKO3 peut être utilisé pour l'échange d'allèles. Or, celui-ci code pour la même résistance que *mntH*::Cm. La stratégie qui a été choisie est l'échange de *mntH*::Cm pour *mntH*::Km.

Pour ce faire nous avons construit le plasmide pKO35'Km3' (Makui, Roig et al. 2000; Boyer, Bergevin et al. 2002). Ce plasmide est constitué d'un insert en trois parties. La première partie, appelée 5', correspond à un fragment d'environ 800 pb identique à la région en 5' du cadre de lecture de *mntH* de *S. Typhimurium*. Celle-ci est reliée à une cassette de résistance à la kanamycine par un site *NcoI* (correspondant au codon de départ de *mntH*). Elle même reliée, par un site *XbaI* (correspondant au codon stop de *mntH*) à une troisième partie, appelée 3', qui correspond à un fragment d'environ 800 pb identique à la région en 3' du cadre de lecture de *mntH* de *S. Typhimurium*.

Pour construire ce plasmide, la partie 5' a été amplifiée, à partir de l'ADN génomique de *S. Typhimurium*, à l'aide de la PCR 5'Styp (tableau 4) et des amorces 5'StypF et 5'StypR (tableau 3). La cassette de résistance à la kanamycine a été amplifiée, à partir de p34s-Km, à l'aide de la PCR Kana (tableau 4) et des amorces KanaF et KanaR (tableau 3). Après digestion par *NcoI-PstI* de la partie 5' et par *NcoI-XbaI* de la cassette kanamycine, ces fragments ont été liés à pGBM6 digéré par *PstI-XbaI*, pour former le plasmide intermédiaire pGBM65'Km. Les clones ont été sélectionnés sur une gélose LB supplémentée de kanamycine et de spectinomycine. Après extraction, les plasmides obtenus ont été vérifiés par digestion *NcoI-NotI*, *NcoI-XbaI*, et *PvuI*.

La partie 3' a été amplifiée, à partir de l'ADN génomique de *S. Typhimurium*, à l'aide de la PCR 3'Styp (tableau 4) et des amorces 3'StypF et 3'StypR (tableau 3). Cependant, une quantité très faible d'ADN ayant été obtenue, une seconde PCR, avec les mêmes amorces, a été effectuée à partir de ce premier produit PCR. Après digestion par *XbaI-KpnI* de la partie 3', ce fragment a été lié à pGBM65'Km digéré par les mêmes enzymes, pour former le plasmide pGBM65'Km3'. Après extraction des plasmides, ceux-ci ont été vérifiés par digestion *SspI*, *PvuI*, *HinfI*, *NarI*, *NotI-NcoI*.

Suite à cela, nous nous sommes aperçus qu'une erreur avait été commise sur l'identité du codon de départ du gène *mntH*. En effet, le codon ATG choisi (site *NcoI* de la partie 5') n'était pas celui qui avait été décrit comme codon de départ (Kehres, Zaharik et al. 2000).



Et comme ce détail sera important pour la construction des plasmides pKO35'*mntH3*', un nouveau fragment 5', plus long, a donc été amplifié à partir de l'ADN génomique de *S. Typhimurium*, à l'aide de la PCR 5'Styp2 (tableau 4) et des amorces 5'StypF et 5'StypR2 (tableau 3). Après digestion par *NcoI-PstI*, ce nouveau fragment a été lié à pGBM65'Km3' digéré par les mêmes enzymes. Les clones ont été vérifiés, à l'aide de la PCR sur colonie V5'styp2 (tableau 4) et les fragments 5' et 3' du nouveau plasmide pGBM65'Km3' ont été séquencés.

Le plasmide pKO3 ayant une origine de répllication thermosensible, toutes les étapes à venir ont été effectuées à 30 °C. Le plasmide pKO35'Km3' a été construit en liant la cassette 5'Km3', provenant du bon plasmide pGBM65'Km3' digéré par *NotI*, à pKO3 lui aussi digérés par *NotI*. Les bactéries portant le bon plasmide ont été vérifiées à l'aide de la PCR pKO3 (tableau 4) et, après l'extraction des plasmides, par digestion à l'aide des enzymes *PvuI*, *SspI*, *NotI*, et *NcoI*.

La délétion du gène *mntH* de *S. Typhimurium*, a pu être réalisée grâce aux propriétés du plasmide pKO3 (Link, Phillips et al. 1997). Premièrement, ce plasmide contient une origine de répllication thermosensible qui force le plasmide à s'intégrer au génome à 43 °C, sous pression sélective (chloramphénicol), à l'aide d'une première recombinaison homologue. Deuxièmement, le plasmide contient un gène *sacB*, qui métabolise le sucrose en un composé toxique. Ceci force l'expulsion du plasmide, à l'aide d'une seconde recombinaison. Les clones ayant effectué une seconde recombinaison différente de la première (fragment opposé) vont donc porter, dans leur génome, la cassette de résistance à la kanamycine à la place du gène *mntH*. Ils ont ainsi pu être sélectionnés. Le plasmide pKO35'Km3' a été introduit dans *S. Typhimurium sitA-D* par électroporation. Une dizaine de colonies ont été prélevées et dispersées dans 1 ml de milieu LB. Ensuite, 100 µL de ce mélange et des dilutions  $1.10^{-1}$ ,  $1.10^{-2}$ ,  $1.10^{-3}$ , ont été étalés sur des géloses LB contenant du chloramphénicol (première recombinaison). Après une incubation de 16 h à 43 °C, une dizaine de colonies ont été prélevées et mélangées à 1 ml de milieu LB. 100 µL de ce mélange et des dilutions  $1.10^{-1}$ ,  $1.10^{-2}$ ,  $1.10^{-3}$ , ont été étalés sur des géloses LB contenant de la kanamycine et du sucrose 5 % (seconde recombinaison). Après une incubation de 16 h à 30 °C, les colonies (M2S) apparaissant

sur la gélose, sont celles qui ont effectué la double recombinaison homologue et portent donc une cassette de résistance à la kanamycine à la place du cadre de lecture de *mntH*.

Nous avons effectué un buvardage de type Southern (décrit précédemment) pour vérifier que la délétion avait bien été effectuée. L'ADN génomique de *S. Typhimurium* et de deux mutants indépendants M2S, ont été extraits et digérés par les enzymes *HindIII* et *PstI*. Les clones ont été analysés par buvardage de type Southern à l'aide de la sonde radioactive 5'.

### 3.8 Construction des plasmides pKO35'*mntH3*'

Le but de l'étude des homologues est de les insérer à la place du gène *mntH* de *S. Typhimurium sitA-D::Sm*. Il s'agit donc, de construire une série de plasmides pKO3 portant les cadres de lecture, des différents homologues sélectionnés, sous contrôle du promoteur natif du gène *mntH* de *S. Typhimurium*. Les codons de départ ainsi que les codons stop, des différents gènes *mntH* introduits, devaient correspondre à ceux du gène *mntH* de *S. Typhimurium*. C'est pourquoi, les sites *NcoI* et *XbaI* ont été choisis car leur séquence contient, respectivement, un codon de départ et un codon stop. Tous les cadres de lecture de *mntH* des différents homologues, déjà amplifiés par PCR et clonés dans pBAD24, avaient un site *NcoI* (ou *BspHI*) correspondant à leur codon de départ. Cependant, le site *XbaI* ne correspondait pas, pour certains, au codon stop. Dans ces cas là, certains cadres de lecture ont dû être amplifiés à nouveau, avec de nouvelles amorces, afin que les sites *XbaI* correspondent aux codons stop. Le cadre de lecture du gène *mntH* de *E. chrysanthemi* a été amplifié à l'aide de la PCR Echry2 (tableau 4), et des amorces EchryF et EchryR2 (tableau 3) à partir du plasmide pBAD::EchryA. Après digestion de ce produit PCR, par *NcoI-XbaI*, il a été lié au plasmide pGBM65'Km3', pour former le plasmide pGBM65'Echry3'. Ce plasmide a été vérifié, par digestion, à l'aide des enzymes *PstI*, *SspI*. De plus, la cassette 5'Echry3' a été séquencée.

Tous les autres cadres de lecture ont été clonés dans le plasmide pGBM65'Echry3' digéré par *NcoI-XbaI*. Les cadres de lecture du gène *mntH* de *S. Typhimurium*, *X. campestris*, *S. mutans* ont été amplifiés à l'aide, respectivement, des PCR Styp2, Xcamp2 et Smut2 (tableau 4) et des couples d'amorces respectifs, StyNco-

StypR2, XcampF-XcampR2 et SmutF-SmutR2 (tableau 3), à partir des plasmides respectifs pBAD ::StypA, pBAD ::XcamC $\alpha$ , et pBAD ::SmutC $\beta$ . Après digestion de ces produits PCR, par *NcoI-XbaI*, ils ont été liés séparément au plasmide pGBM65'Echry3', pour former, respectivement, les plasmides pGBM65'Styp3', pGBM65'Xcamp3' et pGBM65'Smut3'. Le cadre de lecture du gène A' de *S. marcescens*, a été amplifié à partir de l'ADN génomique, à l'aide de la PCR SmarA' (tableau 4) et du couple d'amorces SmarA'F-SmarA'R (tableau 3). Le produit PCR, digéré par *BspHI-XbaI*, a été lié à pGBM65'echry3' digéré par *NcoI-XbaI*. Le plasmide, issu de cette ligation, a été nommé pGBM65'SmarA'3'.

Ensuite, toutes les cassettes 5'*mntH3*' ont été extraites des plasmides pGBM65'*mntH3*' par digestion *NotI* et ont été liées à pKO3, digéré par la même enzyme. Les bactéries, portant la cassette 5'*mntH3*' dans pKO3, ont été sélectionnées à l'aide de la PCR sur colonie pKO3 (tableau 4). Les plasmides correspondants ont été vérifiés par digestion *NcoI-XbaI*, *NotI*, et *SspI*. Les différents plasmides pKO35'*mntH3*' ont été introduits dans les mutants *S. Typhimurium* M2S, par électroporation. À noter, que pour une raison inconnue, nous avons obtenu un plasmide pKO35'Styp3', non fonctionnel. Ce plasmide porte l'insert mais ne confère pas de phénotype différent du plasmide pKO3. Ce plasmide a donc été utilisé comme témoin négatif en supplément du plasmide pKO3.

### 3.9 Tests de sensibilité aux métaux et aux oxydants des souches *E. coli* et *S. Typhimurium*

Les tests de diffusion ont été utilisés pour déterminer la sensibilité des différents mutants aux métaux ou à certaines molécules oxydantes. Ces tests ont déjà été décrits : les tests de sensibilité aux métaux des souches *E. coli* DH11S *mntH*, portant les plasmides pBAD :: MntH dans (Makui, Roig et al. 2000) et les tests de sensibilité aux oxydants pour les mutants *E. coli* dans (Bergevin 2003) et pour les souches *S. Typhimurium* dans (Boyer, Bergevin et al. 2002). Cependant, certaines modifications ont été apportées.

Brièvement, les souches *E. coli* DH11S *mntH*, portant les plasmides pBAD :: MntH, ont été mises en culture durant 16h à 37°C à 250 RPM, dans du milieu LB supplémenté des antibiotiques correspondants. Ces cultures ont été diluées (1/300) dans 3

ml de milieu LB et incubées jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0,6. Ces nouvelles cultures ont été diluées (1/30) dans 7,5 ml milieu Top-GTA à 50 °C (comprenant les réactifs suivants ajoutés fraîchement : arabinose  $6.10^{-2}$  %, vitamine B1 0,1 %,  $MgSO_4$  0,01 M et ampicilline  $100 \mu g.ml^{-1}$ ). Ce mélange a été déversé rapidement sur une gélose de 40 ml milieu GTA (comprenant les mêmes réactifs ajoutés fraîchement), dans une boîte de Pétri de 15 cm de diamètre. Après 15 min d'attente, pour que le milieu Top-GTA durcisse, 5 disques (Whatman N° 2, 6 mm de diamètre) par gélose, ont été déposés à la surface de chaque gélose. Les disques contenaient 10  $\mu L$  de  $FeSO_4$  (1 M),  $CoCl_2$  (0,25 M),  $ZnCl_2$  (0,25 M),  $CdCl_2$  (0,125 M), ou  $MnCl_2$  (1 M). Après une incubation de 16 h à 37°C, les diamètres d'inhibition de croissance ont été mesurés.

Dans le cas des tests de sensibilité aux oxydants, des mutants *E. coli*, ou *S. Typhimurium*, le protocole varie peu. Les souches ont été mises en culture dans du milieu LB supplémenté des antibiotiques correspondants durant 16h à 37°C à 250 RPM (30 °C si les souches *S. Typhimurium* portaient les plasmides pKO3). Ces cultures ont été diluées (1/300) dans 3 ml de milieu LB et incubées jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0,6 pour *E. coli* et 0,4 pour *S. Typhimurium*. Ces nouvelles cultures ont été diluées (1/30) dans 3 ml milieu Top-LB (avec arabinose  $6.10^{-2}$  %, ou chloramphénicol  $10 \mu g.ml^{-1}$  dans certains cas) puis déversées rapidement sur une gélose de 15 ml milieu LB (Avec arabinose  $6.10^{-2}$  %, ou chloramphénicol  $10 \mu g.ml^{-1}$  dans certains cas). Après 15 min d'attente, des disques (1/gélose) contenant 10  $\mu L$  de ménadione (1,5 M), t-BOOH (0,5 M) ou  $H_2O_2$  (8,94 M), ont été déposés au centre de la gélose. Après une incubation de 16 h à 37 °C (30 °C si les souches *S. Typhimurium* portaient les plasmides pKO3), les diamètres d'inhibition de croissance ont été mesurés.

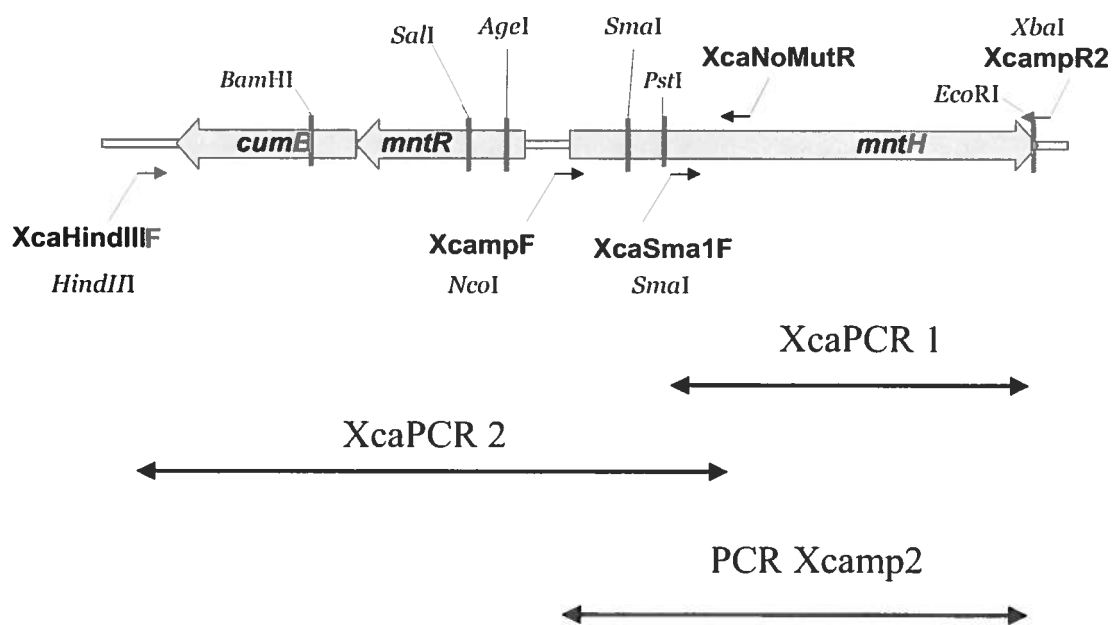
À noter que les pinces, servant à déposer les disques, ont été lavées dans l'eau, dans l'éthanol 75 %, flambées et refroidies avant chaque dépôt de disques pour éviter les effets croisés entre les métaux ou entre les oxydants.

**Figure 5. Représentation schématique des différents fragments utilisés pour la construction des plasmides pK18.**

Le fragment XcaPCR1 a été amplifié à l'aide de la PCR XcaPCR1 (tableau 4), à partir de l'ADN de pBAD ::XcampC $\alpha$  et à l'aide du couple d'amorces XcaSmaIF-XcampR2 (tableau 3). Ce fragment a servi à la construction du plasmide intermédiaire pK18clon1.

Un fragment, appelé XcaPCR2 (partie *mntR*), a été amplifié à l'aide de la PCR XcaPCR2 (tableau 4), à partir d'ADN génomique et à l'aide du couple d'amorces XcaHindIIIIF-XcaNoMutR (tableau 3). Ce fragment a servi à la construction des plasmides intermédiaire pK18*mntH*, pK18mntH-R (Cm), pK18recon1.

Un fragment, appelé Xcamp2 (partie *mntH*), a été amplifié à l'aide de la PCR Xcamp2 (tableau 4), à partir de pBAD ::XcampC $\alpha$  et à l'aide du couple d'amorces Xcamp2F-Xcamp2R (tableau 3). Ce fragment a servi à la construction du plasmide pK18comp.



### 3.10 Construction des plasmides pour la fabrication des mutants *X. campestris*

#### - Construction du plasmide pK18clon1.

Le fragment XcaPCR1 (figure 5 partie *mntH*), digéré par *Sma*I et *Eco*RI, a été lié à **pK18MobSacB** (gracieusement de CVector), digéré par les mêmes enzymes de restriction, afin de produire le plasmide pK18clon1. Les plasmides ont été vérifiés par une double digestion *Sph*I-*Eco*RI.

#### - Construction du plasmide pK18clon2.

La cassette de résistance au chloramphénicol, extraite de p34S-Cm digéré par *Sma*I, a été insérée dans pK18clon1 digéré par la même enzyme. Les clones ont été sélectionnés par double résistance kanamycine et chloramphénicol. Après l'extraction des plasmides, ceux-ci ont été vérifiés par digestion *Eco*RI

#### - Construction du plasmide pK18 mntH.

Le fragment XcaPCR2 (figure 5 partie *mntR*), digéré par *Sma*I et *Bam*HI, a été lié à pK18clon1 digéré par les mêmes enzymes de restriction, pour produire le plasmide pK18 mntH. Les plasmides ont été vérifiés par digestion *Sma*I, *Hind*III-*Eco*RI, *Sal*I et *Clal*-*Eco*RI.

#### - Construction du plasmide **pK18 mntH (Tet)**

Ce plasmide contient une partie de l'opéron *mntR mntH*, dont le cadre de lecture de *mntH* est interrompu par une cassette de résistance à la tétracycline. Ce plasmide a servi à la construction des mutants *X. campestris mntH::Tet*. La cassette de résistance à la tétracycline, extraite de p34S-Tet digéré par *Sma*I, a été liée à pK18 mntH digéré par la même enzyme. Les clones ont été sélectionnés par double résistance kanamycine et tétracycline. Le plasmide, issu de cette ligation, a été appelé pK18 mntH (Tet). Après extraction des plasmides, ceux-ci ont été vérifiés par digestion *Clal*, *Sal*I, *Sph*I, *Kpn*I et *Xba*I-*Eco*RI.

#### - Construction du plasmide pK18mntH-R (Cm)

Ce plasmide contient l'opéron *cumB-mntR-mntH*. Cependant, une partie de *mntR*, du promoteur et une partie de *mntH* ont été éliminées et remplacées par une cassette de résistance au chloramphénicol. Ce plasmide a été construit après ligation des produits de digestion *Sal*I-*Hind*III de pK18clon2 et XcaPCR2 (figure 5). Les clones ont été

sélectionnés par double résistance kanamycine et chloramphénicol. Après l'extraction des plasmides, ceux-ci ont été vérifiés par digestion *EcoRI-HindIII*, *Sall*, et *SphI*. Ce plasmide aurait du servir à la construction des mutants *X. campestris mntH-R::Cm*. Or, lors de l'échange d'allèles, des faux positifs (résistants au chloramphénicol mais dont l'opéron *mntR mntH* était intact) ont été sélectionnés.

- Construction du plasmide **pK18mntH-R (Gm)**

La cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pK18mntH-R (Cm) a été échangée avec la cassette de résistance à la gentamycine. Cette dernière, extraite de p34S-Gm digéré par *SmaI*, a été liée à pK18mntH-R (Cm) digéré par la même enzyme. Les clones ont été sélectionnés par double résistance kanamycine et gentamycine et vérifiés par la suite, après extraction des plasmides, par digestion par *BglII*, *BamHI*, *KpnI-NcoI* et *HindIII*. Ce plasmide a servi à la construction des mutants *X. campestris mntH-R::Gm*.

- Construction du plasmide intermédiaire pK18reconI

Ce plasmide est le fruit de la ligation des produits de digestion *PstI-HindIII* du plasmide pK18MobSacB et du produit PCR XcaPCR2 (figure 5). Après extraction des plasmides, ceux-ci ont été vérifiés par digestion par *BamHI*.

- Construction du plasmide **pK18comp**

Ce plasmide porte en fait l'opéron *cumB-mntR-mntH* complet et intact. Il a été construit par ligation des produits de digestion par *PstI-XbaI* du plasmide pK18reconI et du produit PCR Xcamp2 (figure5). Après extraction des plasmides ceux-ci ont été vérifiés par digestion par *BamHI*, *EcoRI-HindIII*, *Sall*, et *SphI*.

- Construction du plasmide **pK18mntR (Sm)**

Ce plasmide comprend une partie de l'opéron *cumB-mntR-mntH*, dont le cadre de lecture de *mntR* est interrompu par une cassette de résistance à la streptomycine. Ce plasmide a servi à la construction des mutants *X. campestris mntR::Sm*. Pour la construction de ce plasmide, la cassette de résistance à la streptomycine, extraite de p34S-Sm3 digéré par *SmaI*, a été liée à pK18comp digéré par *AgeI-Sall* et traité à la T4 DNA polymérase pour générer des bout francs. Les clones ont été sélectionnés par double résistance kanamycine, et streptomycine Les plasmides, après extraction, ont été vérifiés par digestion par *BamHI*, *SmaI*, *NcoI*, *Sall*, *BglII-XbaI*, *BspHI* et *AgeI*.



### 3.11 Construction du plasmide de complémentation pCRH (*cumB-mntR-mntH*)

Ce plasmide, portant l'opéron *cumB-mntR-mntH*, consiste en un vecteur qui pourra être maintenu dans *X. campestris* sans intégration, car l'origine de répllication est compatible avec cette souche bactérienne. Plusieurs versions de ce plasmide, portant d'autres résistances pouvant être utilisées avec *X. campestris*, ont été construites, à partir de pBBRI-Tp (ATCC 87448) (Kovach, Elzer et al. 1995). Ceux-ci ont été construits par ligation du produit de digestion de pBBRI-Tp par *NheI-NcoI*, traité à la T4 DNA polymérase, avec les cassettes de résistances extraites, par digestion par *SmaI*, de p34S-Sm3 (pBBRI-Sm), de p34S-Km (pBBRI-Km), de p34S-Tet (pBBRI-Tet).

L'insert de pK18comp, extrait par digestion *NheI-XbaI*, a été lié au produit de digestion de pBBRI-Tet par *XbaI*, pour former le plasmide pCRH. Les plasmides ainsi générés ont été vérifiés par PCR sur colonie VRH (tableau 4). Après l'extraction des plasmides, ceux-ci ont été vérifiés par digestion par *HindIII*, *NcoI-XbaI*, *SmaI*, et *SacI*.

Le plasmide pCRH a été transformé, par la méthode TSS, dans la souche *E. coli* S17- $\lambda$ pir, et introduit, dans *X. campestris mntR-H*, par conjugaison tel que décrit dans la partie 3.12. Les souches *mntR-H* portant le plasmide pCRH, ont été sélectionnées sur géloses TYG supplémentées d'ampicilline, de gentamycine, et de tétracycline.

### 3.12 Conjugaison et échange d'allèles dans *X. campestris* pv *campestris*

Les plasmides pK18mntH (Tet), pK18mntH-R (Gm), pK18mntR (Sm), ont été introduits dans la souche donneuse *E. coli* S17- $\lambda$ pir (Simon 1983; Boyer, Bergevin et al. 2002), par transformation à l'aide de la méthode chimique TSS. Les bactéries ayant reçu le plasmide, ont été sélectionnées par double résistance kanamycine, streptomycine (et par la résistance portée par l'insert lorsque celle-ci était différente de la streptomycine).

Des colonies isolées de chaque souche *E. coli*, ont été mises en culture, durant 16h à 37 °C, à une vitesse de 250 RPM, dans du milieu LB supplémenté des antibiotiques appropriés. Les souches de *X. campestris* ont été mises en culture, 24 h avant, dans du milieu TYG avec ampicilline. Lorsque les deux cultures ont atteint une DO<sub>600</sub> de 0,4, il a été centrifugé séparément 1 mL de la culture des souches S17- $\lambda$ pir et 5 ml de la culture de

*X. campestris* (ratio 1 :5) (Schafer, Tauch et al. 1994). Pour éviter que l'une ou l'autre des souches soit tuée par les antibiotiques, tout le milieu a été enlevé. L'un des deux culots a été dispersé dans 1 ml de milieu TYG. Le second culot a ensuite été dispersé à l'aide du premier mélange. La solution contenant les deux souches, a été centrifugée à 8000 RPM et le culot a été dispersé dans 100 µL de milieu TYG. Ces 100 µL ont été déposés sur une gélose TYG et celle-ci a été incubée durant 16h à température ambiante.

Ensuite, la culture a été grattée, dispersée à l'aide de 1ml de milieu TYG liquide, et récoltée. Il a été étalé 80 à 125 µL par gélose de ce mélange, sur plusieurs géloses sélectives de TYG supplémentées de sucrose 10 %, d'ampicilline, et de l'antibiotique porté par l'insert. Les mutants ayant effectué la double recombinaison productive, ont donc été sélectionnés en une seule étape. En effet, la cassette de résistance portée par l'insert, permet de sélectionner les souches *X. campestris* ayant reçu le plasmide et donc l'ayant intégré. Ce plasmide ne peut pas être maintenu dans *X. campestris* car l'origine de répllication n'est pas compatible (Schafer, Tauch et al. 1994). De plus, les plasmides pK18mobsacB (Schafer, Tauch et al. 1994) codent pour la protéine SacB qui métabolise le sucrose, présent dans la gélose, en un composé toxique (Steinmetz, Le Coq et al. 1983; Gay, Le Coq et al. 1985). Donc les seules bactéries qui ont pu croître sur la gélose, ont été celles qui portent la cassette de résistance intégrée dans leur génome et qui ont expulsé le reste du plasmide. L'ajout d'ampicilline dans la gélose, a pour but d'éliminer les contaminations par *E. coli* S17-λpir. Les colonies isolées (en général 2) ont été striées sur des géloses sélectives.

Les constructions ont été ensuite vérifiées par buvardage de type Southern tel que décrit dans la partie 3.2.8.

### **3.13 Protocole des tests phénotypiques des mutants *X. campestris*.**

Les deux protocoles qui ont été utilisés pour vérifier l'effet des mutations, ont été : les courbes de croissance et la mesure des sensibilités à certains produits par la méthode des tests de diffusions.

Dans les deux cas, les différents mutants ont été mis en culture dans 3 ml de milieu SB avec les antibiotiques correspondants, à 30°C et à une vitesse de 200 RPM. Les

cultures ayant atteint la phase stationnaire (de 24 à 48h) ont été diluées jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0,4. Ensuite, 1 ml de cette dilution a été rajoutée à 3 ml de milieu SB sans antibiotique ( $DO_{600}$  finale de 0,1). Ces nouvelles cultures ont alors été incubées à 30°C et à une vitesse de 200 RPM.

Dans le cas des courbes de croissance les  $DO_{600}$  ont été lues, aux temps 0, 4, et 8h, (dilution 1/2) et 24h, 48h, 72h (dilution 1/10). Après chaque lecture, les tubes ont été remis à incuber à 30°C et à une vitesse de 200 RPM.

Le protocole des tests de diffusion a déjà été décrit (Mongkolsuk, Whangsuk et al. 2000), mais il a été légèrement modifié. Les cultures ( $DO_{600}$  égale à 0,4), ont été diluées dans du milieu Top-SB à 50 °C (1ml de culture, 10 ml de milieu). Les tubes ont été mélangés par inversion. Le tout a été déposé sur une gélose de 40 ml de milieu SB-Agar, dans une boîte de Pétri de 15 cm de diamètre. Après un temps d'attente de 15 min, pour que le Top-SB durcisse, des disques (papier Whatman No. 2 de 6 mm de diamètre) imbibés de 10  $\mu$ l des différents produits ont été déposés sur la gélose. Par gélose, 5 disques ont été déposés pour les tests de sensibilité aux métaux, et 3 pour les tests de sensibilité aux oxydants. Lorsque des disques contenant des produits différents, ont été déposés successivement, les pinces ont été lavées dans un bain d'eau stérile, puis d'éthanol 75%, puis brûlées à la flamme. Les géloses ont été mises à incuber à 30 °C et les zones d'inhibition de croissances ont été mesurées après 24 et 48 h (cela pour que certains mutants à croissance lente, atteignent la phase stationnaire. En général, les valeurs ne variaient pas mais elles étaient seulement plus visibles). Les produits ayant été déposés sur les disques ont été : t-BOOH 0,5 M,  $H_2O_2$  0,5 M, ménadione 1,5 M,  $MnCl_2$  1 M,  $CdCl_2$  0,25 M,  $CuCl_2$  1 M.

### 3.14 Outils de statistique et de bioinformatique.

Le test t-Student (Milton 1992) a été utilisé pour déterminer si les moyennes étaient significativement différentes. Celui-ci a été calculé à l'aide du logiciel Microsoft EXCEL (fonction TEST.STUDENT), en comparant les valeurs des mutants avec celle de la souche sauvage. Lorsque celui-ci a pu être calculé, le degré de confiance est indiqué sur les différents graphiques par \* ( $p < 0,05$ ) ou \*\* ( $p < 0,01$ ). Dans le cas des expériences présentant la moyenne de deux valeurs, le test n'a pas pu être appliqué. Cependant, lorsque cela est précisé, les expériences ont été faites plusieurs fois et les mêmes ordres de sensibilité ont été observés, mais avec des valeurs différentes.

Le logiciel VectorNTI Suite 7.0 (Informax, Bethesda, MD), a été utilisé pour générer les alignements des différentes protéines, ainsi que pour déterminer le pourcentage de GC de différentes séquences d'ADN (paramètre 200 nucléotides). De plus, ce logiciel a été utilisé pour analyser les séquences, pour la planification des clonages et l'analyse des sites de restriction, et pour la représentation des constructions. Les identifications de gènes ou de protéines, à partir de séquences disponibles (NCBI, Sanger Institute), ont été faites grâce à la recherche d'homologie à l'aide des programmes BlastX et BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les pourcentages de similarité ou d'identité entre deux séquences ont été déterminés en utilisant le programme « BlastP Two Sequences » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

## 4. RÉSULTATS

## 4.1 Expression, à l'aide du plasmide pBAD, des homologues dans *E. coli* DH11S *mntH*

### 4.1.1 Choix des protéines MntH

Afin de caractériser un échantillon suffisamment large de protéines MntH, nous avons sélectionné des protéines provenant en majorité de souches proches de la famille des entérobactéries, car nos deux systèmes de caractérisation étaient *E. coli mntH* et *S. Typhimurium* isolat Keller *mntH sitA-D*. Cela nous a permis d'augmenter les possibilités que ces protéines soient exprimées à des taux similaires. De plus, nous avons sélectionné des protéines de groupe C qui présentaient des indications de transfert horizontal, comme SmutC $\beta$  ou XcamC $\alpha$  (Richer, Courville et al. 2003). Un autre exemple de transfert horizontal possible est la protéine WbreC $\beta$  (Richer, Courville et al. 2003), qui est d'un intérêt tout particulier, car le génome de *Wigglesworthia brevipalpis* est relativement petit (700 kb). Ceci suggère que cette bactérie s'est spécialisée dans la symbiose intracellulaire et aurait perdu de nombreux gènes superflus (Akman, Yamashita et al. 2002).

La majorité des protéines MntH testées provient de bactéries appartenant à l'ordre des Enterobacteriaceae comme *Escherichia coli* (EcolA), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolat Keller (StypA), *Erwinia chrysanthemi* (EchrA), *Serratia marcescens* (SmarA et SmarA'), *Wigglesworthia brevipalpis* (WbreC $\beta$ ). Ces bactéries appartiennent toutes à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries, ordre des Enterobacteriaceae, famille des Entérobactéries. Les bactéries *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (XcamC $\alpha$ ) et *Pseudomonas fluorescens* (PfluCy) appartiennent aussi à la classe des  $\gamma$ -protéobactéries mais, respectivement, à l'ordre des Xanthomonadales, famille des Xanthomonaceae et à l'ordre des Pseudomonadales, famille des Pseudomonaceae. D'autres protéines testées appartiennent à des bactéries phylogénétiquement plus éloignées de nos systèmes de caractérisation. La bactérie *Nostoc punctiforme* (NpunC $\alpha$ ) n'appartient pas au phylum des protéobactéries, comme les précédentes. Cette bactérie appartient au phylum des Cyanobactéries, ordre des Nostocales, et famille des Nostocaceae. De même, la bactérie *Streptococcus mutans* (SmutC $\beta$ ) appartient au phylum des Firmicutes (Gram positif), classe des Bacillus, ordre des Lactobacillales, famille des Streptococcaceae.

Enfin, *Chlorobium tepidum* (CtepB) appartient au super-phylum des Bacteroidetes (Bactérie phototrophe sulfureuse verte), phylum des Chlorobis, ordre des Chlorobiales famille des Chlorobiaceae.

Toutes ces espèces représentent également, un échantillon large de bactéries pathogènes différents. Nous avons choisi des espèces qui sont spécialisées dans l'infection de mammifères comme *Salmonella*, qui peut causer des maladies qui vont de la salmonellose à la fièvre typhoïde, des espèces étant spécialisés dans la pathogénèse chez les plantes comme *Erwinia chrysanthemi* (pourriture molle) ou *Xanthomonas campestris* (nervation noire). Nous avons aussi choisi des agents pathogènes opportunistes comme *S. mutans*, une bactérie de la flore buccale et qui est associée à la formation de caries dentaires, ou *S. marcescens* qui peut être associée à des pathologies chez certains patients immunodéprimés. De plus, certaines espèces sont capables de survivre dans de nombreuses niches écologiques comme *S. marcescens*, *N. punctiforme*, *Chlorobium tepidum* (anaérobie stricte). Enfin, on y retrouve des bactéries symbiotiques comme *N. punctiforme* qui fixe l'azote et établie des symbioses avec de nombreuses plantes ou champignons ou comme l'entérobactérie *Wigglesworthia brevialpis*, une bactérie intracellulaire obligatoire de la mouche Tsé-Tsé, vecteur du paludisme.

#### 4.1.2 Recherche d'homologues MntH actifs

Comme il a été décrit dans la partie matériel et méthodes, les différents gènes *mntH* ont été clonés dans pBAD24, sous contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Pour minimiser les différences, le même codon de départ (ATG), correspondant au site de restriction *NcoI* du plasmide pBAD, a été utilisé pour tous les cadres de lecture. Nous avons commencé par tester l'activité de transport de chaque protéine à l'aide de la méthode des tests de diffusion des métaux précédemment décrite (Makui, Roig et al. 2000). Les résultats sont présentés dans la figure 6. À noter que, pour des raisons de clarté, les valeurs du témoin négatif ont été soustraites aux valeurs des différents homologues. Les valeurs représentent donc la sensibilité strictement due à l'expression des protéines MntH.

La figure 6-A présente la moyenne des sensibilités aux différents métaux, dues à l'expression, avec  $6.10^{-2}$  % d'arabinose, des différents homologues de la protéine MntH. Cette méthode mesure, indirectement, le transport des métaux. En effet, une augmentation de l'entrée du métal, va entraîner une augmentation de la sensibilité pour ce métal.

Le témoin négatif, EcolA D34G, ne confère une sensibilité significative qu'en présence de cadmium. Celle-ci se traduit par une zone d'inhibition de croissance de 1,1 cm. Malgré tout, cette sensibilité n'est pas due à un transport de métaux. Il a été démontré par Spectrométrie de Masse (ICP-MS) que le transport de manganèse et de cadmium, par EcolA D34G, est inexistant (Chaloupka, Courville et al. 2005). Donc, ceci démontre qu'une sensibilité au cadmium seulement, ne peut être associée à un transport de métaux par MntH (Chaloupka, Courville et al. 2005). De la même façon, les protéines SmarA, NpunC $\alpha$ , et PfluC $\gamma$ , ne montrent qu'une sensibilité stricte au cadmium, se traduisant par une zone de sensibilité respectivement de 1,5, 1,1 et 1,3 cm. Il est donc très probable que celle-ci ne reflète pas un transport réel de métaux.

Les protéines du groupe A, EcolA, StypA, et EchrA, montrent des niveaux similaires d'activité de transport. On observe respectivement des zones d'inhibition de 1,5, 1,2 et 1,5 cm en présence de FeSO $_4$ , de 1,9, 1,6 et 1,9 cm en présence de CoCl $_2$ , de 1,1, 0,7 et 1 cm en présence de ZnCl $_2$ , et finalement de 1,8, 1,6 et 1,6 cm en présence de CdCl $_2$ . La protéine SmarA' montre un profil d'activité similaire même si celui-ci semble globalement inférieur à ceux des autres protéines du groupe A (en présence de FeSO $_4$  1,2 cm, de CoCl $_2$  1,3 cm, de ZnCl $_2$  0,3 cm, de CdCl $_2$  0,9 cm).

La protéine CtepB présente un profil similaire aux protéines EcolA, StypA et EchrA, (1,2 cm au FeSO $_4$ , 1,7 cm au CoCl $_2$ , 0,8 cm au ZnCl $_2$ ). Cependant, le transport de cadmium par cette protéine semble être légèrement moins efficace (zone de 1,0 cm au CdCl $_2$ ).

Les protéines du groupe C montrent des profils d'activité variables. La protéine XcampC $\alpha$  montre une sensibilité pour le CoCl $_2$  similaire à celle des protéines du groupe A (1,5 cm), et une activité au cadmium moindre (0,8 cm). Il ne semble pas que l'expression de cette protéine entraîne une sensibilité aux autres métaux. WbreC $\beta$  montre une sensibilité faible à la majorité des métaux testés (0,8 cm au FeSO $_4$ , 0,4 cm au CoCl $_2$ , 0,6 cm au ZnCl $_2$  et 0,8 cm au CdCl $_2$ ). La protéine SmutC $\beta$  a une activité qui semble

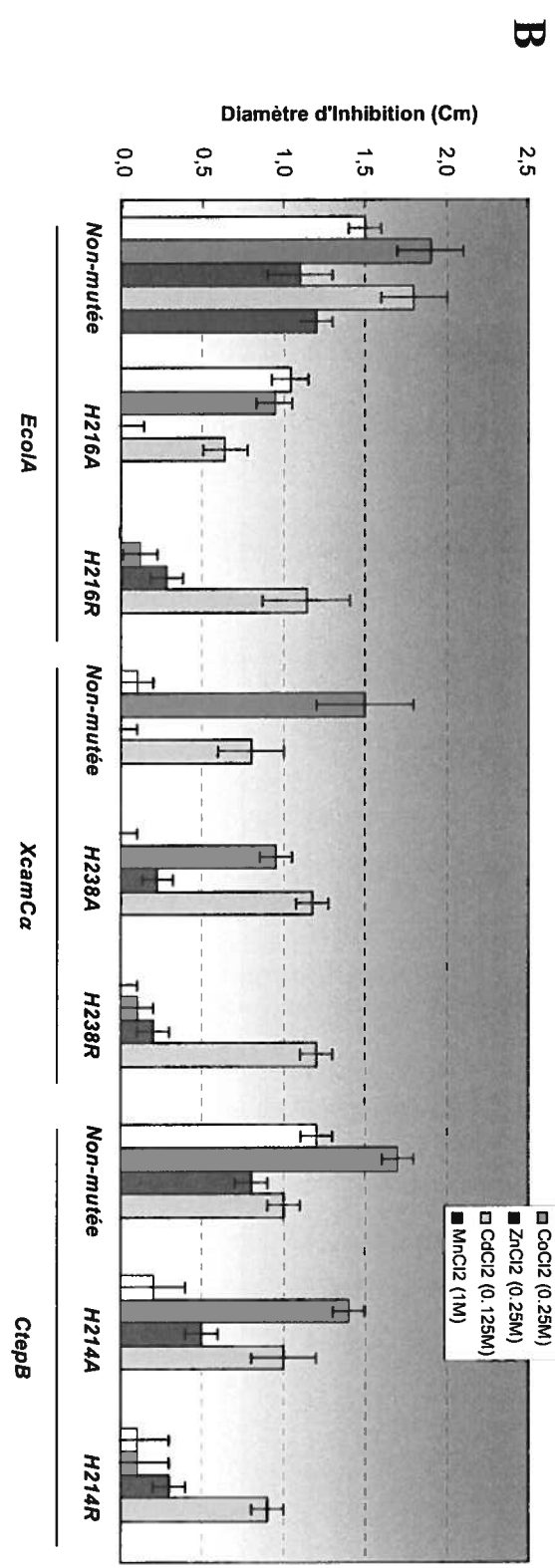
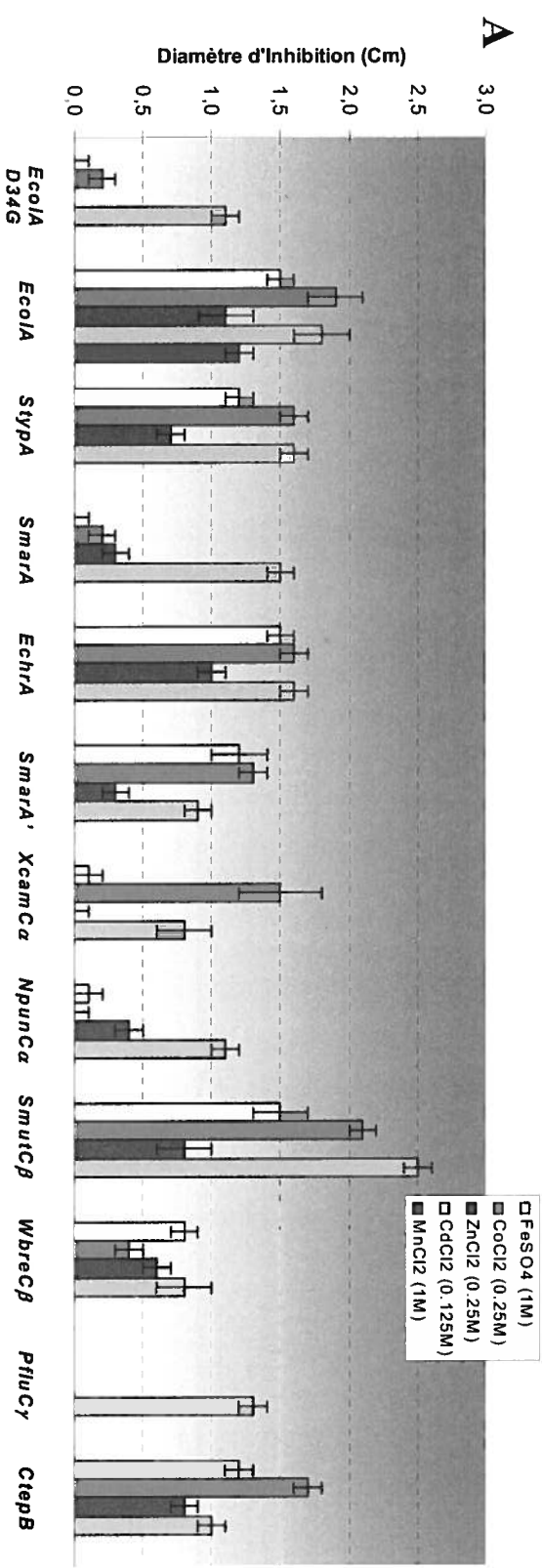


supérieure à toutes les autres protéines, en présence de  $\text{CoCl}_2$  et de  $\text{CdCl}_2$  (respectivement 2,1 cm et 2,5 cm). Les sensibilités en présence de  $\text{FeSO}_4$  et de  $\text{ZnCl}_2$  (1,5 cm et 0,8 cm) sont similaires à celle des protéines EcolA, StypA et EchrA.

On se doit de remarquer que, excepté EcolA (1,1 cm), aucun homologue n'a de zone d'inhibition visible en présence de  $\text{MnCl}_2$ . De même, le témoin négatif (*E. coli* DH11S *mntH*, pBAD24) ne montre aucune sensibilité à ce métal, contrairement aux autres métaux comme le  $\text{FeCl}_2$  (1,3 +/- 0,1 cm),  $\text{CdCl}_2$  (1,1 +/- 0,1 cm),  $\text{ZnCl}_2$  (1,5 +/- 0,2 cm) et au  $\text{CdCl}_2$  (1,6 +/- 0,2 cm) (Résultats non montrés). Il existe un autre test de mesure indirecte du transport de manganèse. Celui-ci consiste en la complémentation de la souche SL93, par les homologues MntH dans le système pBAD. Cette souche porte une mutation thermosensible, qui peut être compensée par l'ajout de manganèse (Makui, Roig et al. 2000; Courville, Chaloupka et al. 2004; Chaloupka, Courville et al. 2005). EchrA, EcolA, XcamC $\alpha$ , par ordre d'efficacité, sont capables de compléter la mutation à 43 °C alors que SmutC $\beta$ , NpunC $\beta$ , WbreC $\beta$  n'en sont pas capables.

**Figure 6. Sensibilité aux cations divalents des souches *E. coli* DH11S *mntH*, dépendante de l'expression dans le système pBAD, d'homologues MntH (A) et des protéines EcolA, CtepB et XcamCa mutées (B).**

Les différentes cultures, en phase exponentielle, des souches de *E. coli* DH11S *mntH*, pBAD ::MntH, ont été étalées sur milieu GTA, en présence de disques imprégnés de 10  $\mu$ L de FeSO<sub>4</sub> (1M), CoCl<sub>2</sub> (0,25M), ZnCl<sub>2</sub> (0,25M), CdCl<sub>2</sub> (0,125M) ou MnCl<sub>2</sub> (1M). Après une incubation de 16 h, les zones d'inhibition de croissance ont été mesurées. Pour chaque protéine, deux clones indépendants ont été testés au minimum deux fois. De plus un témoin négatif (*E. coli* DH11S *mntH*, pBAD24) et un témoin positif (*E. coli* DH11S *mntH*, pBAD :: EcolA) ont été utilisés pour toutes les expériences. Les expériences, où les témoins avaient des valeurs aberrantes, ont été exclues. De plus, les valeurs du témoin négatif pBAD24 ont été soustraites aux valeurs des différents homologues.



### 4.1.3 Expression des homologues

Le marquage métabolique en milieu minimum, a été utilisé pour vérifier et comparer l'expression et la stabilité des différentes protéines MntH. Les expériences ont toujours été faites avec un témoin négatif (*E. coli* DH11S *mntH* pBAD24) et un témoin positif (*E. coli* DH11S *mntH* pBAD :: *EcolA*). L'utilisation de ces deux témoins nous a permis une comparaison plus objective et exclue les variations d'expression dues à la manipulation (taux de radioactivité, taux d'arabinose...).

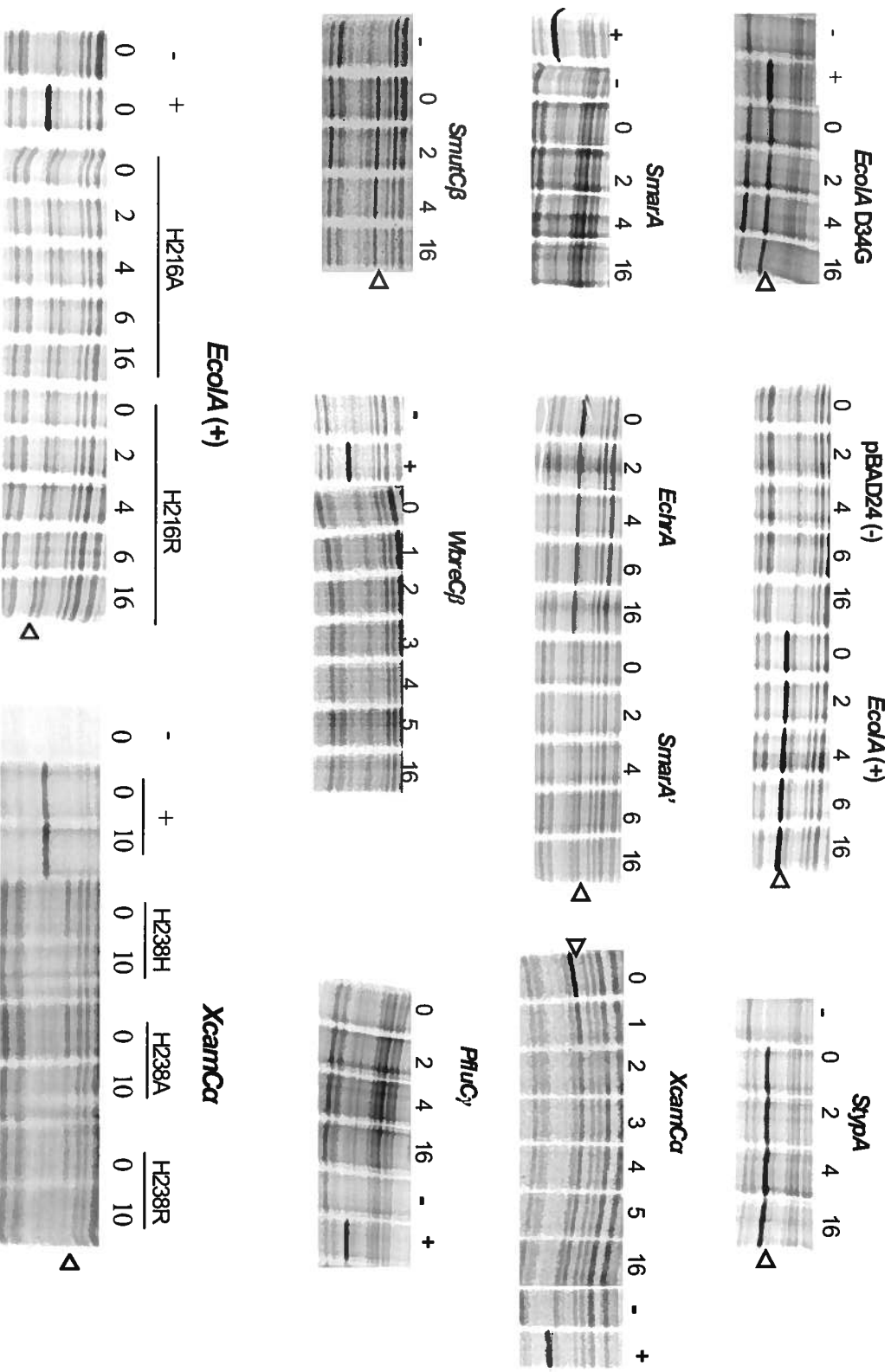
L'expression des différents homologues est présentée sur la figure 7-A. Les protéines du groupe A (*EcolA*, *StypA*) sont exprimés de façon très similaire et ont les taux les plus élevés. *EchrA* semble être légèrement moins bien exprimés. Les protéines provenant de *S. marcescens* ont des niveaux d'expression très inférieurs, la protéine *SmarA'* est exprimée très faiblement, et l'on n'arrive pas à détecter la protéine *SmarA* de façon objective.

Les homologues du groupe C sont exprimés de façon moins efficace que *EcolA*. La protéine *SmutC $\beta$* , et *XcampC $\alpha$*  sont exprimées de façon détectable. Cependant, la protéine *XcampC $\alpha$*  ne semble pas être stable. En effet, après 16h on observe une diminution visible du nombre de protéines radioactives. Cette expérience a été répétée plusieurs fois et l'un des résultats est intégré à la figure 7-B. La même diminution est observée après 10h. Cette protéine est la seule, de toutes les protéines MntH testées, ayant une expression visible, qui a été observée comme étant significativement instable au cours du temps. Les autres homologues testés soit *WbreC $\beta$* , *PfluC $\gamma$* , n'ont pas d'expression détectable.

On peut donc corréler l'absence d'expression avec l'absence d'activité dans le cas des protéines *SmarA*, *WbreC $\beta$* , *PfluC $\gamma$* . Les protéines actives (*SmutC $\beta$* , et *XcampC $\alpha$* , *EcolA*, *StypA*, *EchrA*) semblent avoir une expression visibles. Seule, *SmarA'* semble être active et être exprimée à un taux très inférieur à celui *E. coli*.

**Figure 7. Expression, dans *E. coli* DH11S *mntH* (pBAD ::MntH), des homologues (A) et des protéines EcolA et XcamCa mutées (B), mesurée par marquage métabolique à l'aide de [<sup>35</sup>S]-Méthionine.**

Les différentes souches de *E. coli* DH11S *mntH* pBAD :: MntH, ont été mises en culture dans du milieu minimum. Les gènes ont été induits avec 0,2 % d'arabinose durant 5 min avant l'ajout de la [<sup>35</sup>S]-Méthionine à 0,04  $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Après 30 min d'incubation, la méthionine non radioactive (0,5 %) a été rajoutée. Le même nombre de CPM, normalisé grâce à la mesure à t=0, a été déposé et le taux de protéines a été analysé à l'aide de gel SDS-Page. Les expériences ont toujours été faites avec un témoin négatif (*E. coli* DH11S *mntH* pBAD24) et un témoin positif (*E. coli* DH11S *mntH* pBAD :: EcolA). L'utilisation de ces deux témoins nous a permis une comparaison plus objective et exclue les variations d'expression dues à la manipulation (taux de radioactivité, taux d'arabinose....).



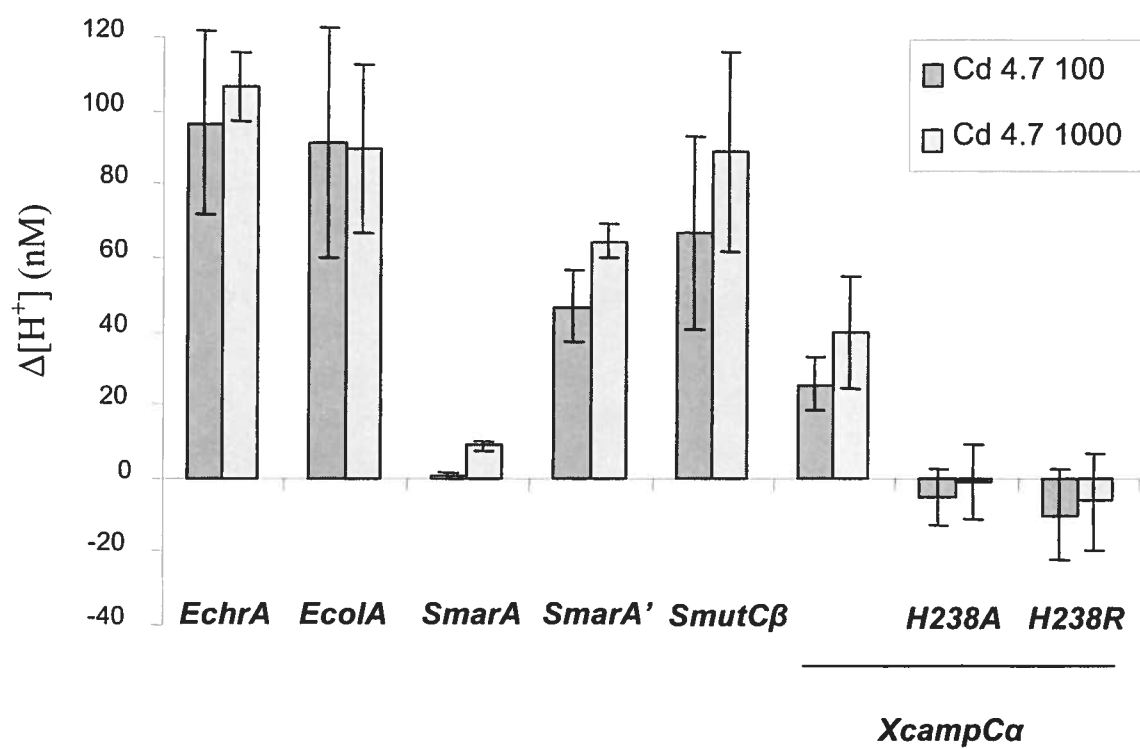
#### 4.1.4 Transport de protons par les homologues exprimés dans le système pBAD

Lors de cette étude, il a été construit un outil permettant de mesurer l'activité de transport de protons (Courville, Chaloupka et al. 2004; Chaloupka, Courville et al. 2005). Il s'agit d'une GFP (Green Fluorescent Protein) ratiométrique. Cette GFP ratiométrique a un spectre différent en fonction du pH de la bactérie (Miesenbock, De Angelis et al. 1998; Olsen, Budde et al. 2002). Nous avons démontré que cet outil permet donc de mesurer, indirectement, le transport de protons par les protéines MntH (Courville, Chaloupka et al. 2004; Chaloupka, Courville et al. 2005). Nous avons donc mesuré le transport de protons par les homologues en fonction des métaux. Les résultats du transport de protons en présence de cadmium, sont présentés dans la figure 8. Ces expériences ont été effectuées par Roman Chaloupka. Nous confirmons par ce test que WbreC $\beta$  (Veyrier, Castillo et al. 2004), SmarA (figure 8), ainsi que NpunC $\alpha$  (Veyrier, Castillo et al. 2004), n'ont pas une activité très importante pour le transport de protons, qui peut être corrélée avec une activité de transport de métal faible ainsi qu'une absence d'expression. Cependant on remarque que les autres protéines à savoir EcolA, EchryA, SmarA', XcamC $\alpha$ , SmutC $\beta$  (figure 8), et CtepB (Veyrier, Castillo et al. 2004), sont capables de transporter des protons en présence de cadmium. Nous confirmons grâce à cette expérience que les protéines EcolA, EchryA, SmarA', XcamC $\alpha$ , SmutC $\beta$ , et CtepB sont bien des symporteurs métaux/protons.

**Figure 8. Caractérisation fonctionnelle du transport de protons, en présence de cadmium, dépendant de l'expression des homologues MntH.**

Résultats du transport de protons, à pH 4,7, de certaines protéines et des mutants XcamC $\alpha$ , en présence de 100  $\mu$ M et 1 mM de CdCl<sub>2</sub>. Les souches *E. coli* DH11S  $\Delta$ *mntH* (pGBM6-pH, pBAD::*MntH*) (OD<sub>600</sub> 0,2) ont été incubées 1h en présence de 0,06% d'arabinose, avant la mesure de fluorescence. Le transport de protons dépendant de l'expression des homologues, a été mesuré à pH 4,7, 500s après l'ajout de métal. Le ratio d'excitation R de la GFP ratiométrique (410/470 nm) dépend du pH intracellulaire. Celui-ci a été converti en concentration intracellulaire de protons, à l'aide d'une courbe de calibration (Chaloupka, Courville et al. 2005).





#### 4.1.5 Impacts de mutations identiques sur l'histidine de trois représentants des groupes A, B et C

Nous avons effectué une mutagenèse identique à un membre de chaque groupe A, B et C pour comparer l'impact fonctionnel et vérifier les différences entre les groupes. Nous avons mesuré l'expression (excepté CtepB) (figure 7-B), les sensibilités aux métaux (figure 6-B) et le transport de protons (figure 8), des protéines EcolA, XcamC $\alpha$  et CtepB, dont on a remplacé l'histidine (H), respectivement en position 216, 238 et 214, soit par une alanine (A), soit par une arginine (R). Le tableau 5 présente le pourcentage d'activité (sensibilité aux métaux), en fonction des métaux, des protéines mutées par rapport à l'activité de la protéine non mutée. Les protéines EcolA H216A et H214R, sont exprimées à des taux similaires, mais on observe, malgré tout, une expression moins importante que la protéine non mutée EcolA. Par contre, les protéines XcampC $\alpha$  H238A et H238R et la protéine non mutée XcampC $\alpha$  sont exprimées à des taux similaires. De plus, dans le cas des trois protéines on observe objectivement une diminution du nombre de protéines après 10h.

En général, on observe une diminution globale de l'activité des protéines qui est plus drastique lorsque l'on remplace l'histidine par une arginine que par une alanine. Par exemple, dans le cas des trois protéines, on observe une diminution de sensibilité en présence de CoCl<sub>2</sub>, en comparant la protéine EcolA non mutée (1,9 cm) avec les protéines mutées H216A (0,9 cm) ou H216R (0,1 cm). Il en est de même, lorsque l'on compare la protéine non mutée XcampC $\alpha$  (1,5 cm) avec H238A (0,9 cm) et pour H238R (0,2 cm). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les mutants CtepB (non muté 1,7 cm, H214A 1,4 cm, et H214R 0,3cm). Malgré tout, il semble que, dans le cas du cobalt, EcolA soit la plus affectée par la mutation comme on le constate aussi grâce au pourcentage d'activité des protéines mutées par rapport aux protéines non mutées (tableau 5). Par contre, en présence de fer, la mutation de l'histidine affecte plus CtepB que EcolA. L'effet au cadmium est assez surprenant. En effet, dans le cas des protéines mutantes EcolA, le mutant H216R (1,2 cm) semble plus sensible que le mutant H216A (0,6 cm). Dans le cas des mutants CtepB, la sensibilité n'est pas significativement affectée par les mutations, alors que dans le cas des mutants XcampC $\alpha$ , la sensibilité semble augmenter (1,2 cm) par

rapport à la protéine non mutée (0,8 cm). Cependant, comme semble le montrer la mesure du transport de protons dans le cas des protéines XcamC $\alpha$  (figure 8), EcolA (Chaloupka, Courville *et al.* 2005) et CtepB (résultats non montrés) ces sensibilités, comme dans le cas de EcolA D34G, ne sont peut-être pas dues à un transport réel. En présence de zinc, une diminution de sensibilité est visible dans le cas des mutants EcolA H21A (0 cm) et H216R (0,3 cm), en comparaison avec la protéine non mutée (1,1 cm) il en est de même avec les mutants CtepB, mais de façon moins importante (tableau 5). Dans le cas des protéines mutantes XcampC $\alpha$ , cette sensibilité semble augmenter légèrement pour H238A (0,2 cm), par rapport à la protéine non-mutée et H238R qui ne montre pas plus de sensibilité que les souches *E. coli* DH11S *mntH*, pBAD24. La mutation de l'histidine affecte les protéines dans le cas des trois groupes malgré tout, toutes ne semblent pas être affectées de la même façon, ce qui suggère que ces différences pourraient être spécifiques à chacun des groupes.

**Tableau 5. Sensibilité à différents métaux, de souches *E coli* exprimant les homologues MntH, de groupe A, B, et C portant des mutations identiques.**

	FeSO4 1 M	CoCl2 0.25 M	ZnCl2 0.25 M	CdCl2 0.125 M
EcolA H216A	85§	53	0	38
EcolA H216R	0	5	25	69
CtepB H214A	17	82	63	100
CtepB H214R	8	6	38	89
XcamC $\alpha$ H238A	0	77	0	110
XcamC $\alpha$ H238R	0	8	0	110

§ exprimées en pourcentage de sensibilité des souches *E coli* exprimant les homologues MntH non mutés respectifs.

## 4.2 Phénotype du mutant *S. Typhimurium mntH, sitA-D* (M2S)

### 4.2.1 Vérification du mutant *S. Typhimurium mntH ::KmR, sitA-D :: SmR*

Les travaux d'Elise Boyer l'ont amené à créer un certain nombre de mutants chez *S. Typhimurium* (Boyer, Bergevin et al. 2002) dont le mutant *mntH ::Cm*, le mutant *sitA-D ::Sm*, et le double mutant *mntH ::Cm, sitA-D ::Sm*. Différents phénotypes avaient alors été observés pour le mutant MS : une virulence atténuée, dans un modèle de cellules Raw264.7 *Nramp1<sup>-/-</sup>*, une sensibilité accrue à l' $H_2O_2$ , ainsi qu'un important défaut de croissance en présence de DP. Ces phénotypes ont pu être complétés, en partie, par la surexpression de MntH, à l'aide du plasmide pSKmntH. Ce plasmide a un haut nombre de copies par cellule et contient le gène *mntH* de *S. Typhimurium* et son promoteur. Ces résultats ont suggéré la possibilité de compléter ces phénotypes par l'expression des différents homologues. Nous avons donc entrepris la complémentation à l'aide des homologues dans le système pBAD, et par l'expression des gènes codant pour les différents homologues, sous contrôle du promoteur normal. Le but final est d'insérer ces dernières constructions dans le génome, afin de générer des mutants stables pouvant servir à des tests d'infection *in vivo*.

Le plasmide suicide pKO3 (Link, Phillips et al. 1997) a déjà été utilisé avec succès dans *E. coli* (Makui, Roig et al. 2000) et dans *S. Typhimurium* (Boyer, Bergevin et al. 2002). Cependant, ce plasmide porte une résistance au chloramphénicol. Or les mutants *mntH*, disponibles dans le laboratoire, avaient été générés à partir d'un plasmide 2003-yfeP-RP4, dérivé du plasmodon pTnMod-RCm (Boyer, Bergevin et al. 2002). Ces mutants *mntH* ont donc leur gène *mntH* interrompu par le plasmide et sont donc résistants au chloramphénicol. Il est donc impossible d'utiliser ces mutants en combinaison avec le plasmide pKO3. L'alternative choisie a donc été de construire une nouvelle souche *mntH ; sitA-D*, dont le gène *mntH* a été remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine. Les nouveaux mutants ont été appelés M2S, et ont été construits à partir du simple mutant *sitA-D*. Le plasmide ayant servi à cet échange, est pKO35'Km3'. Sa construction est décrite dans la partie matériel et méthodes. Les mutants M2S ont été

générés grâce aux propriétés du plasmide suicide pKO3 (Link, Phillips et al. 1997) décrite dans la partie matériel et méthode. Ceux-ci ont donc le cadre de lecture de *mntH* (de l'ATG au codon stop), remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine.

Les mutants ont été vérifiés par buvardage de type Southern. Les profils de restriction, des ADN génomiques des mutants M2S et de la souche sauvage, digérés par *HindIII* (H), et *PstI* (P) et hybridés à la sonde 5', sont présentés dans la partie de gauche de la figure 9-A. Comme attendu, on obtient pour la digestion par *HindIII* des fragments de 4901 pb dans le cas de l'ADN des mutants, et de 8187 pb pour la souche sauvage. De même, on obtient, par digestion *PstI*, des fragments de 3773 pb pour les mutants et 2155 pb pour la souche sauvage. Un témoin positif d'hybridation est aussi présenté. Il s'agit de la cassette 5'Km3' dont la taille est de 2911 pb. Les tailles attendues des fragments, comme schématisé sur la partie de droite de la figure 9-A, confirment que l'échange d'allèles a bien été effectué.

#### 4.2.2 Sensibilité des mutants *S. Typhimurium* *mntH*, *sitA*, et *mntH-sitAD* aux t-BOOH et à la ménadione

Le phénotype de sensibilité du double mutant *mntH*, *sitA-D*, en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, déjà observé (Boyer, Bergevin et al. 2002), a été vérifié, et les mêmes résultats ont été obtenus avec les nouveaux mutants M2S, ce qui confirme que les mutation pTnMod-RCm, et 5'Km3' sont équivalentes.

Comme il a été décrit dans l'introduction, le manganèse est important dans la protection contre le stress oxydatif, et l'entrée de manganèse est très limitée dans les doubles mutants MS (Boyer, Bergevin et al. 2002). Notre but était donc de compléter les sensibilités aux oxydants du mutant M2S, par la surexpression des homologues. Notre choix s'est arrêté sur deux molécules : le tert-butyl hydroperoxyde (t-BOOH), qui est une molécule bien connue comme modèle de stress oxydatif de type peroxyde organique (ROOH), et la ménadione, qui est un générateur d'anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Les sensibilités des différents mutants *S. Typhimurium* ont été testées à l'aide de la méthode des tests de diffusion précédemment décrite (Boyer, Bergevin et al. 2002). Les résultats sont présentés dans la figure 9-C pour le t-BOOH, et figure 9-B pour la ménadione. Les

figures présentent la moyenne d'une expérience en triplicata. De plus, l'expérience a été effectuée au moins trois fois, et les mêmes résultats ont été obtenus (même ordre de sensibilité mais avec des valeurs différentes).

Comme attendu, et observé avec l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Boyer, Bergevin et al. 2002), les mutants M2S sont plus sensibles (5,6 cm) que la souche sauvage (4,3 cm) en présence de t-BOOH (0,5 M). Cependant, contrairement à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , cette sensibilité semble être causée en majeure partie par la délétion du gène *mntH* (4,8 cm), et moindrement par la délétion de *sitA-D* (4,6 cm), en comparaison à la souche sauvage (4,3 cm). Concernant les phénotypes en présence de ménadione, comme observé dans *S. aureus* avec le paraquat, un autre générateur d'anions superoxydes (Horsburgh, Wharton et al. 2002), les mutants M2S sont aussi les plus sensibles (1,9 cm) mais, contrairement au t-BOOH, cet effet semble essentiellement dû à la délétion de *sitABCD* (1,4 cm) car les mutants *mntH* et la souche sauvage ont la même sensibilité (1 cm).

#### **4.2.3 Effets du manganèse et du fer sur la sensibilité au t-BOOH et à la ménadione des mutants *S. Typhimurium* M2S**

Il est bien connu que le fer accroît la sensibilité aux agents oxydants via la réaction de Fenton, alors que le manganèse a plutôt un rôle protecteur. Pour vérifier cela, les sensibilités des mutants M2S, vis-à-vis du t-BOOH et de la ménadione, ont été mesurées en présence de manganèse (10  $\mu\text{M}$ , ou 1mM), de fer (10  $\mu\text{M}$ , ou 1mM), ou des deux métaux (0,5 mM chacun). Les résultats sont présentés dans la figure 9-D.

L'effet du manganèse, sur la sensibilité au t-BOOH, est très visible à une concentration de 1 mM. Lorsque l'on ajoute du manganèse dans le milieu, on observe une diminution de la sensibilité au t-BOOH du mutant M2S (4,1 cm) en comparaison à la sensibilité des mutants M2S sans ajout (5,5 cm). De plus, des résultats préliminaires ont montré que la surexpression de la protéine MntH de *E. coli* dans les mutants M2S, diminue la sensibilité des mutants M2S. Cependant, en présence de manganèse (10  $\mu\text{M}$ , ou 1mM), cette surexpression n'ajoute pas de protection supplémentaire (résultats non montrés). Ceci suggère que des fortes concentrations de manganèse peuvent protéger les bactéries contre l'effet toxique du t-BOOH, avec ou sans MntH. En présence de fer,

l'effet, sur la sensibilité au t-BOOH, est tout autre. La sensibilité du mutant M2S, au t-BOOH (5,5 cm), est augmentée, avec une concentration de  $10 \mu\text{M}$  (5,9 cm), et plus visiblement avec 1 mM de  $\text{FeSO}_4$  (6,3 cm). Ceci suggère que de fortes concentrations de fer augmentent l'effet toxique du t-BOOH. Des résultats préliminaires laissent penser que le fer n'a peu ou pas d'effet lorsque la protéine MntH de *E. coli* est surexprimée. Donc, dans ce cas là, la protéine MntH semble importante pour compenser l'effet du fer. L'action bénéfique de MntH peut être expliquée par une accumulation de manganèse, contrant ainsi l'action toxique du fer en présence de t-BOOH. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'on observe, en présence de fer et de manganèse (0,5 mM chacun), une sensibilité des mutants M2S (4,6 cm) inférieure à celle sans ajout de métal (5,5 cm).

Ce phénomène semble toutefois propre au t-BOOH, car la sensibilité à la ménadione (résultats préliminaires), des mutants M2S (2,1 cm) est augmentée très fortement en présence de fer  $10 \mu\text{M}$  (2,4 cm), ou 1mM (3,8 cm), et dans une moindre mesure en présence de manganèse  $10 \mu\text{M}$  (2,4 cm), ou 1mM (2,6 cm). De plus, l'effet du fer n'est pas corrigé par le manganèse, comme on le voit en présence des deux métaux (3,9 cm).

**Figure 9. Vérification, des mutants *S. Typhimurium sitA-D, mntH ::Km*, par buvardage de type Southern (A). Sensibilité, au t-BOOH (B) et à la ménadione (C), des mutants M, S, et M2S et effet du manganèse et du fer sur la sensibilité du mutant M2S (D).**

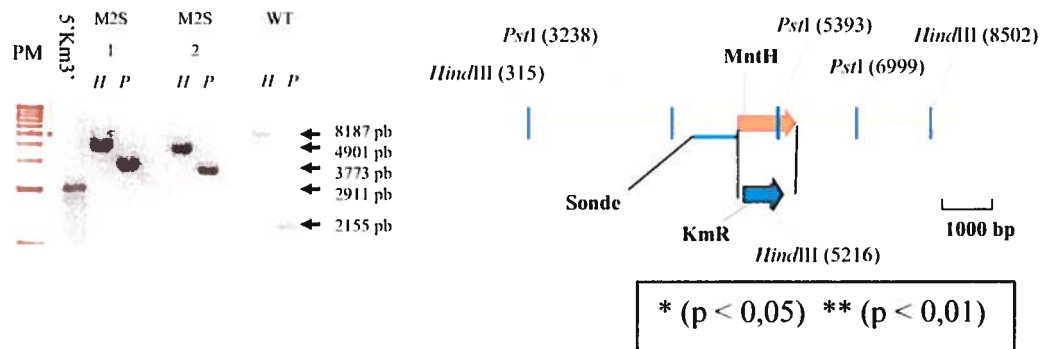
A) Le gène *mntH* a été remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine, grâce au plasmide pKO35'Km3'. La partie de gauche, présente les résultats de l'analyse par buvardage de type Southern de la digestion *HindIII* (H) et *PstI* (P), hybridée à la sonde 5' des ADN génomique de *S. Typhimurium* et de deux mutants indépendants M2S. La partie de droite schématise cette construction.

B et C) Les sensibilités des différents mutants *S. Typhimurium* ont été testées à l'aide de la méthode des tests de diffusions précédemment décrite (Boyer, Bergevin et al. 2002). Les différentes cultures, en phase exponentielle, des souches *S. Typhimurium* ont été étalées sur milieu LB, en présence de disques imprégnés de t-BOOH (0,5M) (B) ou de ménadione (1,5M) (C). Après une incubation de 16 h, les zones d'inhibition de croissance ont été mesurées. Les figures présentent la moyenne d'une expérience en triplicata. De plus, l'expérience a été effectuée au moins trois fois, et les mêmes résultats ont été obtenus (même ordre de sensibilité).

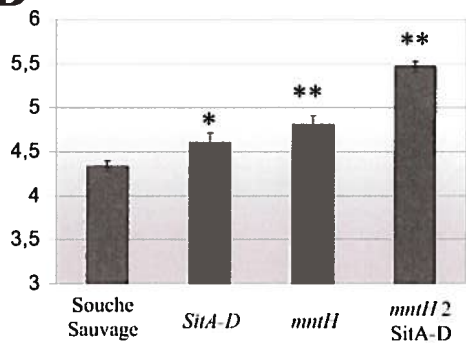
D) Les sensibilités vis-à-vis du t-BOOH (0,5 M) et de la ménadione (1,5 M) (résultats préliminaires) des mutants M2S ont été mesurées en présence de manganèse (10  $\mu$ M ou 1mM), de fer (10  $\mu$ M ou 1mM) ou des deux métaux (0,5 mM chacun). Ces sensibilités ont été mesurées par une adaptation de la méthode des tests de diffusion. Le  $MnCl_2$  et le  $FeCl_2$ , aux concentrations indiquées, ont été préalablement ajoutés aux milieux LB et Top-LB. Les figures présentent la moyenne de trois expériences pour le tBOOH et deux expériences pour la ménadione.



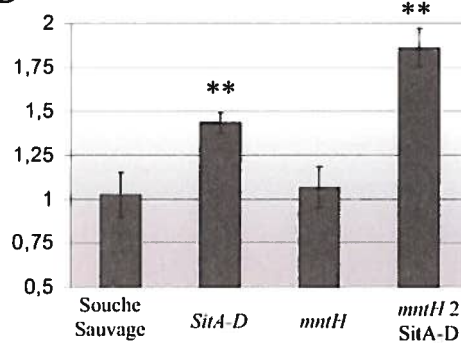
**A**



**B**



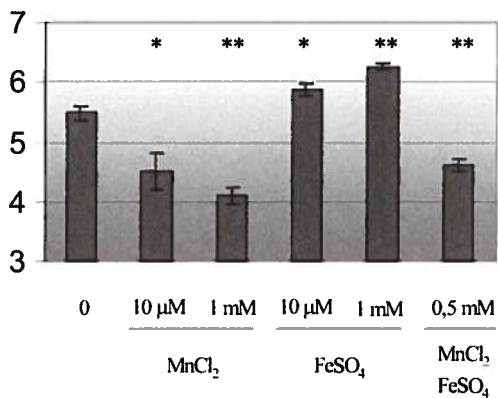
**C**



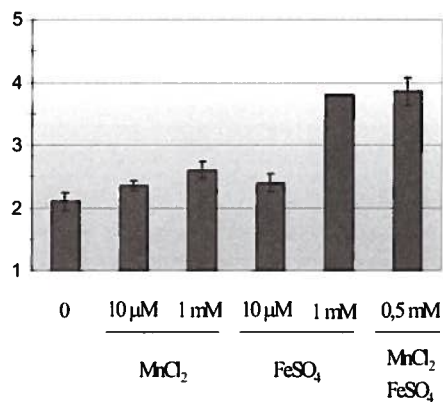
**D**

**S. Typhimurium M2S**

**t-BOOH**



**Ménadione**



Echelle : Zone d'inhibition de croissance (cm)

### 4.3 Complémentation de *S. Typhimurium* *mntH*::Km *sitAD*::Sm par des homologues MntH des groupes A, A', B et C

#### 4.3.1 Complémentation par les homologues exprimés dans le système pBAD

Les premiers résultats montraient que la surexpression de la protéine MntH de *E. coli*, dans le système pBAD, complémente la sensibilité au t-BOOH du mutant *S. Typhimurium* M2S. La suite logique était donc de tester tous les homologues, clonés dans pBAD24, et de vérifier si ceux-ci étaient aussi capables de complémente ce phénotype. De plus, la présence de manganèse et de fer dans le milieu modifie l'effet toxique de la ménadione et du t-BOOH, de manière différente. C'est pourquoi nous avons aussi comparé l'effet de la surexpression des homologues MntH sur la sensibilité du mutant M2S vis à vis de la ménadione.

Les sensibilité des mutants *S. Typhimurium* M2S pBAD :: MntH ont été testées en présence de  $6 \cdot 10^{-2}$  % d'arabinose et d'ampicilline  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , à l'aide de la méthode des tests de diffusion. Les résultats sont présentés dans la figure 10-B pour le t-BOOH, et figure 10-A pour la ménadione.

Comme on le voit sur la figure 10-A et 10-B, les sensibilités à la ménadione et au t-BOOH des témoins négatifs M2S pBAD24 (2,2 et 4,9 cm respectivement) ou pBAD :: *EcolA* D34G (2,0 et 4,9 cm respectivement), sont bien plus importantes que celles de la souche sauvage (1,1 et 4,3 cm respectivement). Ceci implique que les effets qui seront décrits, sont bien dus à une activité de transport et non aux conditions d'expérimentation (arabinose, expression d'une protéine...).

Les phénotypes des mutants M2S exprimant *EcolA*, *StypA*, *EchryA*, et *SmarA*' sont semblables. En effet, leur surexpression entraînent une augmentation de sensibilité en présence de ménadione (respectivement 3,0 ; 2,8 ; 2,8 et 2,5 cm), et une protection contre le t-BOOH (respectivement 4,1 ; 4,1 ; 3,8 et 4,1 cm). Un effet similaire, toutefois moins visible, est observé avec les protéines *XcampC $\alpha$*  (ménadione 2,7 cm et t-BOOH 4,7 cm) et *SmutC $\beta$*  (ménadione 2,6 cm et t-BOOH 4,5 cm). L'effet de *SmutC $\beta$*  est assez surprenant car celui-ci semblait avoir une très bonne activité de transport (supérieure, pour certains métaux, aux protéines du groupe A). Les protéines *SmarA* et *WbreC $\beta$*  n'ont

pas d'effets significativement visibles. Ceci est relativement attendu, car ces protéines ne semblaient pas être exprimées et il n'a pas été observé d'activité de transport pour SmarA et très peu pour WbreC $\beta$ .

L'effet, observé avec la protéine CtepB, est assez atypique car cette protéine ne protège pas contre le t-BOOH (5,3 cm) et augmente la sensibilité à la ménadione (2,8 cm). CtepB semblait avoir une bonne activité de transport du fer, cobalt, zinc, et du cadmium. Il a été observé que le remplacement de l'histidine en position 214 par une alanine ou une arginine, diminue la sensibilité au fer et au cobalt des souches *E. coli* exprimant CtepB. De plus, les protéines CtepB H214A montrent encore des signes de transport de zinc et de cadmium. Pour étayer l'hypothèse de l'augmentation de la sensibilité à la ménadione, due à un transport de métaux via CtepB, nous avons aussi testé les protéines H214A et H214R. Les résultats obtenus sont en accord avec cette hypothèse. Les mutants M2S, exprimant les protéines mutées, ont une sensibilité à la ménadione, inférieure à ceux exprimant CtepB non mutée. Les mutants M2S exprimant CtepB H214A (2,4 cm) et CtepB H214R (2,3 cm), ont des sensibilités du même ordre que lorsque aucune protéine MntH n'est exprimée (pBAD24), ou lorsqu'une protéine MntH non fonctionnelle est exprimée (pBAD :: EcolA D34G).

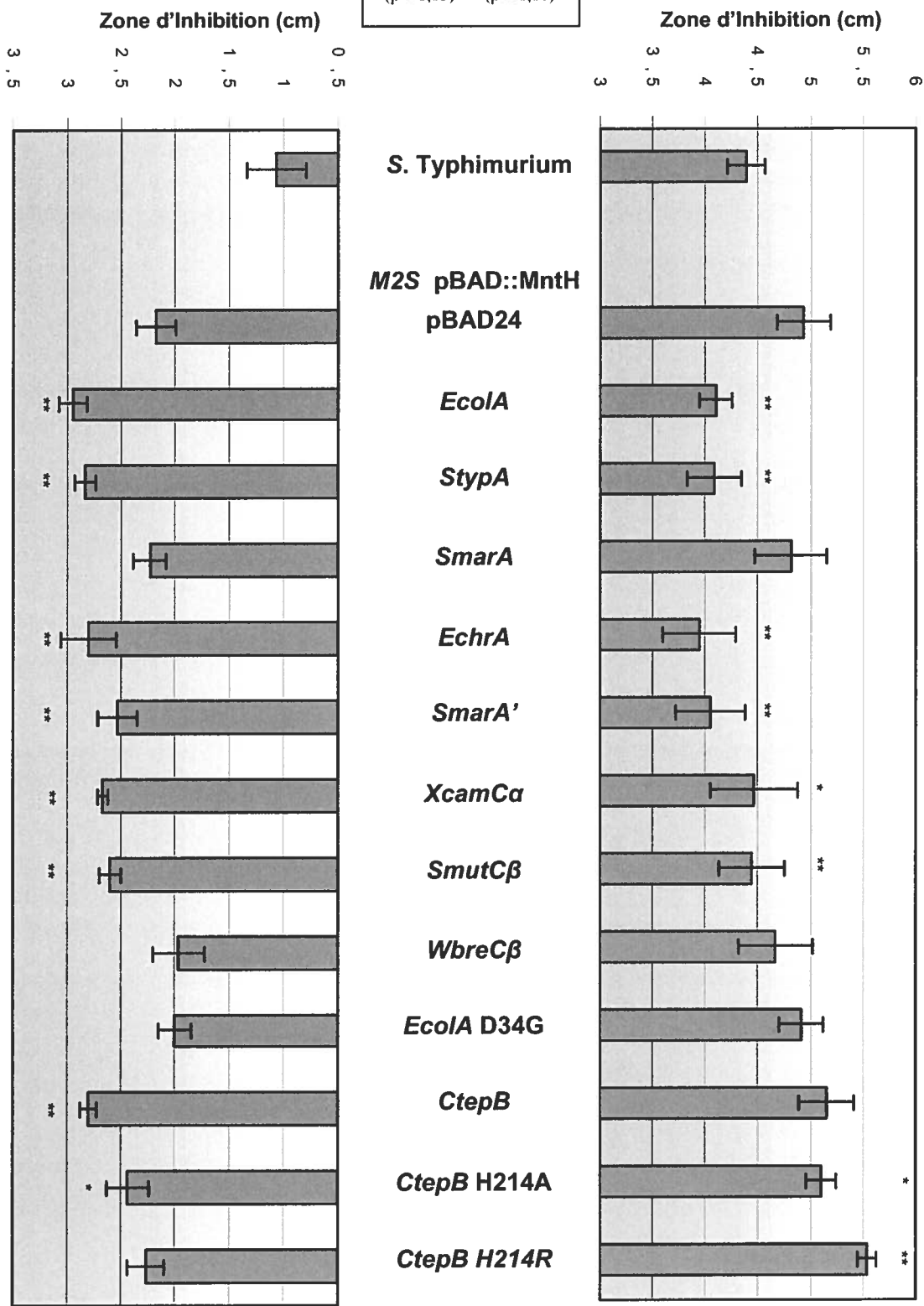
**Figure 10. Effet de l'expression des homologues, dans le système pBAD, sur la sensibilité à la ménadione (A) et au t-BOOH (B) du double mutant *S. Typhimurium* M2S.**

Les sensibilités à la ménadione 1,5M (A) et au tBOOH 0,5M (B) des mutants *S. Typhimurium* M2S (pBAD :: MntH), ont été testées, en présence de  $6.10^{-2}$  % d'arabinose et d'ampicilline  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , à l'aide de la méthode des tests de diffusion. Les figures présentent la moyenne de 4 expériences en duplicata pour le t-BOOH (excepté pBAD ::CtepB et ses mutants, 2 expériences en duplicata), et deux expériences en duplicata pour la ménadione.

### A) Ménadione

### B) tBOOH

\* (p < 0,05) \*\* (p < 0,01)



### 4.3.2 Complémentation de la sensibilité au t-BOOH de M2S par les homologues exprimés dans le système pKO35'*mntH3*'

Les homologues MntH du groupe A et C, présentant une activité de transport significative, ont été sélectionnés. Les cadres de lecture ont d'abord été clonés dans pGBM65'Echry3', et les cassettes *NotI5'mntH3'NotI* ont été transférées dans pKO3. Après la transformation de ces différents plasmides, dans les souches *S. Typhimurium* M2S, les sensibilités ont été testées à l'aide de la méthode des tests de diffusion décrits précédemment. La figure 11-B présente les résultats de sensibilité au t-BOOH, des mutants M2S exprimant ces constructions. Pour cette expérience, un témoin négatif a été utilisé. Il s'agit de pKO35'StypA3' N.F. qui semble avoir la même construction que pKO35'StypA3'F. cependant, pour une raison encore inconnue il n'est pas fonctionnel.

Les résultats qui ont été obtenus à l'aide des différents plasmides pBAD ::MntH, sont confirmés ici. Premièrement, l'effet protecteur de MntH vis-à-vis du t-BOOH est confirmé. Le témoin négatif, M2S pKO35'StypA3' non fonctionnel (5,4 cm), présente une zone d'inhibition similaire au mutants M2S pKO3 (résultats non montrés). De plus cette sensibilité est supérieure à pKO35'EchrA3' (4,3 cm), pKO35'SmarA'3' (4,4 cm) pKO35'StypA3' fonctionnel (4,7 cm), pKO35'XcamCa3' (4,7 cm) et pKO35'SmutCβ3' (4,8 cm).

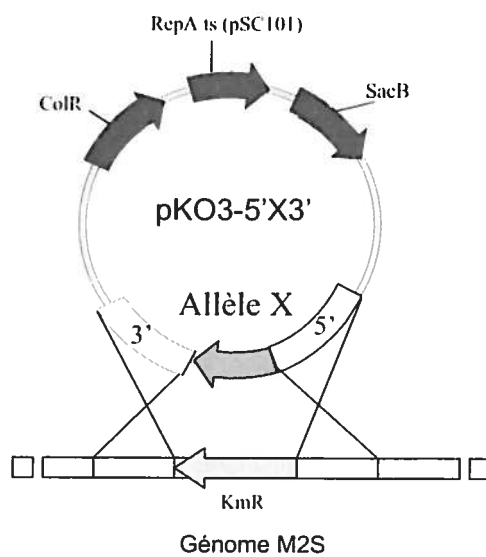
Ce test nous a permis de vérifier la fonctionnalité des plasmides pKO35'*mntH3*', et l'activité des homologues sélectionnés, qui ont été exprimés avec ce plasmide. La suite logique qui sera donnée est l'insertion, dans le génome des mutants M2S, de ces constructions par double recombinaison homologue. Cette insertion est schématisée dans la figure 11-A. Ces insertions se feront en utilisant les propriétés du plasmide pKO3 décrites dans la partie matériel et méthode. Ceci permettra de générer des souches *S. Typhimurium sitA-D*, dont le gène *mntH* (de l'ATG au codon stop) aura été remplacé par le cadre de lecture (de l'ATG au codon stop) d'un des homologues. Ces constructions stables ne nécessiteront pas l'utilisation d'antibiotiques. Il sera alors possible de comparer différents phénotypes à long terme, notamment ceux dans le cadre d'une infection *in vivo*.

**Figure 11. Complémentation du phénotype de sensibilité au t-BOOH du double mutant M2S à l'aide des homologues, exprimés sous le contrôle du promoteur natif de *mntH* de *S. Typhimurium*.**

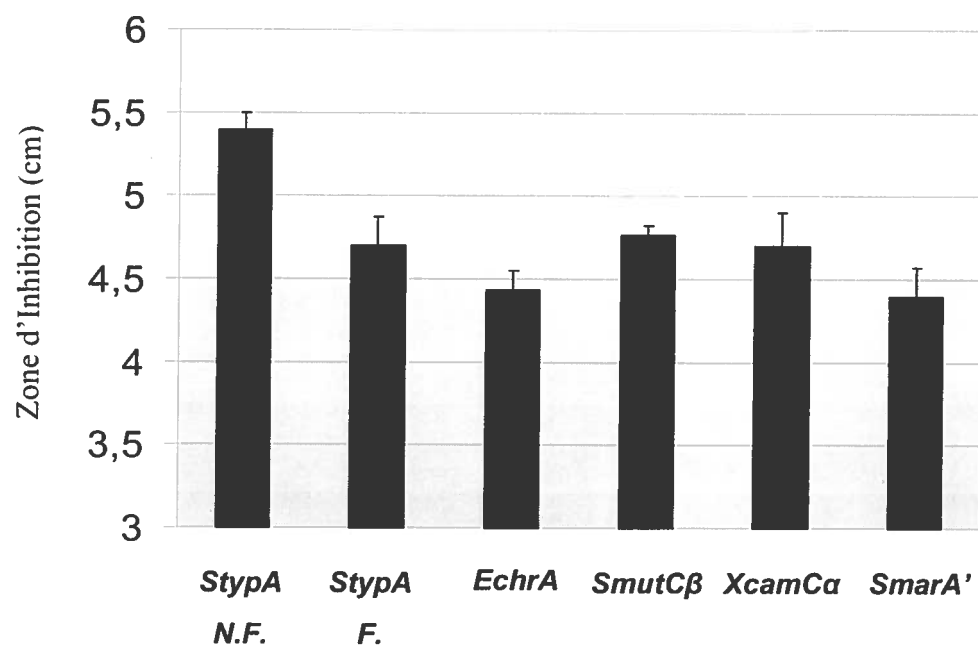
A) Représentation schématique de l'échange d'allèle à l'aide des plasmides pKO35'*mntH3*'. Cet échange sera fait dans le but de générer des mutants stables *S. Typhimurium sitAD* portant un allèle différent du gène *mntH*.

B) La sensibilité au tBOOH (0,5 M), des mutants *S. Typhimurium* M2S (pKO35'*mntH3*') a été testée, en présence de chloramphénicol (10  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ), à l'aide de la méthode des tests de diffusion. Les figures présentent la moyenne d'une expérience en triplicata. Le témoin négatif pKO35'*Styp3*' non fonctionnel, a été obtenu par hasard, et la raison pour laquelle il ne fonctionne pas est inconnue, cependant il montre les mêmes sensibilités que le mutant *S. Typhimurium* M2S (pKO3) (résultats non montrés).

A



B





#### 4.4 Sensibilité de certains mutants *E. coli* à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , au t-BOOH et à la ménadione

Dans la partie précédente, nous avons confirmé la sensibilité des mutants *S. Typhimurium* M2S à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  et utilisé de nouveaux oxydants pour différencier ces souches. Afin de mieux comprendre nos différences de sensibilité aux molécules oxydantes et l'interaction avec les métaux, en particulier avec le métabolisme du fer, nous avons décidé de vérifier la sensibilité de certains mutants de *E. coli* disponibles dans le laboratoire. Ceux-ci sont souvent utilisés comme référence lors de l'étude du stress oxydatif. Certaines de ces souches ont été construites dans le laboratoire (Bergevin 2003), d'autres proviennent du laboratoire du Dre Danièle Touati. Les phénotypes ont été testés par la méthode des tests de diffusion décrite précédemment. Les résultats sont présentés dans le tableau 6. Ce tableau présente les moyennes d'une expérience faite en quatre répétition.

Dans le cas des peroxydes (tableau 6), on observe un effet de la délétion du gène *mntH*, dans les trois différentes souches de *E. coli*. En effet, les mutants *mntH* ont des sensibilités significativement supérieures à celles de la souche sauvages. De plus, que ce soit dans le cas de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bergevin 2003) ou du t-BOOH (Résultats non montrés), cette sensibilité peut être compensée par la présence de manganèse dans le milieu. Dans le cas de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , on remarque dans les trois souches de *E. coli*, un effet cumulatif des mutations *mntH* et *fur*, ce qui confirme des résultats déjà été obtenus (Bergevin 2003). Par contre dans le cas du t-BOOH les mutants *fur* sont trop sensibles et montrent des zones d'inhibition trop grandes pour être mesurables. Il est à noter, qu'en diminuant les concentration de t-BOOH on ne voit pas d'effet cumulatif des mutation *mntH* et *fur* (résultats non montrés). De plus, les sensibilités des mutants *fur* peuvent être corrigées en partie, par l'ajout de fortes concentrations de manganèse dans le milieu (résultats non montrés).

**Tableau 6. Sensibilité des mutants *E. coli* au stress oxydatif.**

Souches	Zone d'inhibition (mm) * (p < 0,05) ** (p < 0,01)		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8,94 M)	t-BOOH (0,5 M)	Ménadione (1,5 M)
<b>MG1655</b>			
S. sauvage	32 +/- 0,5	31 +/- 1,3	24 +/- 1
<i>mntH</i>	35 +/- 0 *	34 +/- 1,5 *	25 +/- 1,7
<i>fur</i>	37 +/- 0,6 **	> 75	29 +/- 1,5 *
<i>fur mntH</i>	41 +/- 0,8 **	> 75	34 +/- 1,5 **
<i>arcA</i>	-	-	36 +/- 0,5 **
<b>EMG2</b>			
S. sauvage	36 +/- 0,6	27 +/- 0,6	12 +/- 0,9
<i>mntH</i>	37 +/- 0 *	29 +/- 1,3 *	11 +/- 0,5
<i>fur</i>	37 +/- 1,2	> 75	22 +/- 0,5 **
<i>fur mntH</i>	41 +/- 1,2 *	> 75	22 +/- 0,8 **
<b>GC4468</b>			
S. sauvage	34 +/- 1	29 +/- 1	09 +/- 0
<i>sodA</i>	-	-	15 +/- 1,7 *
<i>mntH</i>	38 +/- 0,6 *	40 +/- 9	10 +/- 1
<i>fur</i>	34 +/- 1	> 75	22 +/- 0,6 **
<i>sodA mntH</i>	-	-	12 +/- 0,8 *
<i>sodA sodB</i>	-	-	29 +/- 0,5 **
<i>fur mntH</i>	40 +/- 1,2 **	> 75	23 +/- 0,5 **

Dans le cas de la ménadione (tableau 6), on ne remarque aucun effet de la délétion du gène *mntH* et cela, dans les trois souches de *E. coli* testées. Par contre, la mutation *fur* augmente significativement la sensibilité à la ménadione dans les trois souches *E. coli*. Ceci confirme l'effet nocif du fer en présence de ménadione. De plus, cet effet ne semble pas être cumulatif avec la mutation du gène *mntH* à part dans le cas de la souche MG1655. Cependant, la sensibilité de cette souche semble être particulière. En effet, la souche sauvage MG1655 est plus sensible que les souches sauvages EMG2 ou GC4468 (respectivement 24 mm, 12 mm, et 9 mm). Les simples mutants *SodA*, de la souche GC4468, montrent une zone de sensibilité beaucoup plus importante que la souche sauvage (respectivement 15 mm et 9 mm). Cet effet est cumulatif avec la mutation *sodB*, car les mutants *sodA**sodB* ont une sensibilité de 29 mm, ce qui est logique vu que les Sod transforment les anions super-oxydes en composés moins toxiques. Par contre, il est possible que la mutation du gène *mntH* soit légèrement antagoniste à celle de *sodA*, en présence de ménadione, car les mutants *sodA*-*mntH* ont une sensibilité égale à 12 mm. Cette sensibilité est inférieure à la sensibilité du simple mutant *sodA* (15 mm). Enfin, les mutants MG1655 *arcA* montrent une sensibilité beaucoup plus importante en comparaison à la souche sauvage (respectivement 36 mm et 24 mm), ce qui est attendu car ArcA est un régulateur qui est activé, entre autres, par la ménadione, et qui régule des gènes de défense au stress oxydatif (exemple SodA).

#### **4.5 Indications du transfert horizontal de l'opéron supposé *mntR-mntHA'*, chez *Serratia marcescens*.**

Deux protéines SmarA et SmarA', appartenant à *Serratia marcescens*, ont été étudiées. Alors qu'il n'a été observé aucune expression/activité de la protéine SmarA, la protéine SmarA' montre une activité de transport important malgré une très faible expression, et complète les phénotypes du mutant M2S. Il nous a donc paru intéressant de regarder plus en détails le génome de cette bactérie. Pendant la durée de cette étude, les séquences du génome de *S. marcescens* db11 devenaient disponibles (Sanger Institut), d'abord en courts contiguës qui sont, à ce jour, assemblés mais non publiés. Des recherches ont montré que cette souche avait dans son génome deux gènes

*mntH*. Certaines espèces ont plusieurs gènes *mntH*, comme les *Burkholderia cepacia* (C $\gamma$ , A'1 et A'2), *B. fungorum* (2 protéines C $\gamma$ ), *B. pseudomallei* (A'2 et C $\gamma$ ) (Richer, Courville et al. 2003). Cependant, *S. marcescens* db11 se différencie par le fait que, pour la première fois, l'on retrouve dans le même génome deux gènes *mntH* dont l'un code pour une protéine de groupe A, et l'autre de groupe A' (Cellier, non-publié). La protéine SmarA' appartient à un sous-groupe A'1 (Cellier, non-publié) qui contient des protéines proches phylogénétiquement, appartenant à des espèces du genre  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ -protéobactéries, dont l'organisation génomique est très différente d'une espèce à l'autre (Richer, Courville et al. 2003). C'est pour cette raison que nous nous sommes attardés sur l'organisation génomique du gène *mntH* A'1 de *S. marcescens*.

La phylogénie, basée sur l'ADNr 16S des espèces *Yersinia* et *Serratia*, les place comme espèces apparentées. En effet, la protéine MntH du groupe A a un pourcentage de similarité de 90 % (80 % d'identité), avec celui de *Y. pestis*. De plus, l'organisation génomique est similaire à la plupart des autres espèces de  $\gamma$ -protéobactéries (*Y. pestis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*...). En effet, le gène *mntH* est en organisation inverse avec le gène *nupC*, dans une région contenant les gènes *glfX*, *glk*... De plus les analyses des séquences MntH, montre que SmarA est située à la place attendue dans la phylogénie des protéines MntH, c'est à dire dans le groupe des  $\gamma$ -protéobactéries (Cellier, non-publié).

Si le gène SmarA a évolué de façon synchronisée avec le reste du génome de *S. marcescens*, il semble que ce ne soit pas le cas de l'autre protéine MntH SmarA'. *Y. pestis* CO92 semble avoir un pourcentage de GC inférieur à celui de *S. marcescens* (respectivement 48 % et 59,6 %). Malgré ce fait, de toutes les espèces séquencées, la séquence de la protéine MntHA de *Y. pestis* est celle qui est la plus proche de celle *S. marcescens*. Nous avons donc examiné en détail la région génomique du locus *mntHA*' de *S. marcescens*, pour rechercher des indices indiquant la possibilité d'un transfert horizontal, et nous avons comparé ce locus avec un locus colinéaire du génome de *Y. pestis* CO92. Cette comparaison est présentée dans la figure 12. On observe qu'un certain nombre de gènes, dont *mntH*, *mntR* (région I soulignée sur la figure 12), sont insérés dans une région qui, la région I mis à part, est identique à celle de *Y. pestis*.

En effet, la partie à gauche de la région I de *S. marcescens* contient les mêmes gènes, organisés de la même façon et codant pour des protéines ayant un pourcentage de

similarité variant de 96 à 76 % (identité de 91 à 63 %). De la même façon, les gènes à droite de la région I, sont les mêmes et ont un pourcentage de similarité variant de 95 à 70 % (identité de 90 à 60 %). En analysant le GC % de ces régions (paramètre 200 nucléotides) à l'aide du programme VectorNTI (Informax Inc.), on observe quatre diminutions brutales du GC %. Trois (numérotées de 1 à 3, sur la figure 12) sont situées dans la partie à gauche de la région I et une à droite (numéroté 4). Or, les mêmes diminutions sont aussi présentes au même locus du génome de *Y. pestis*. Ces diminutions (probablement fonctionnelles) du pourcentage de GC, ainsi que la similarité des séquences prouvent bien que ces régions sont similaires. De plus, la plupart des gènes de la région I ne semblent pas présents chez *Y. pestis* ou d'autres  $\gamma$ -protéobactéries. Ceci suggère un transfert horizontal de la région I. Ce groupe de gènes aurait été acquis par *S. marcescens* après la séparation de cette espèce au cours de l'évolution.

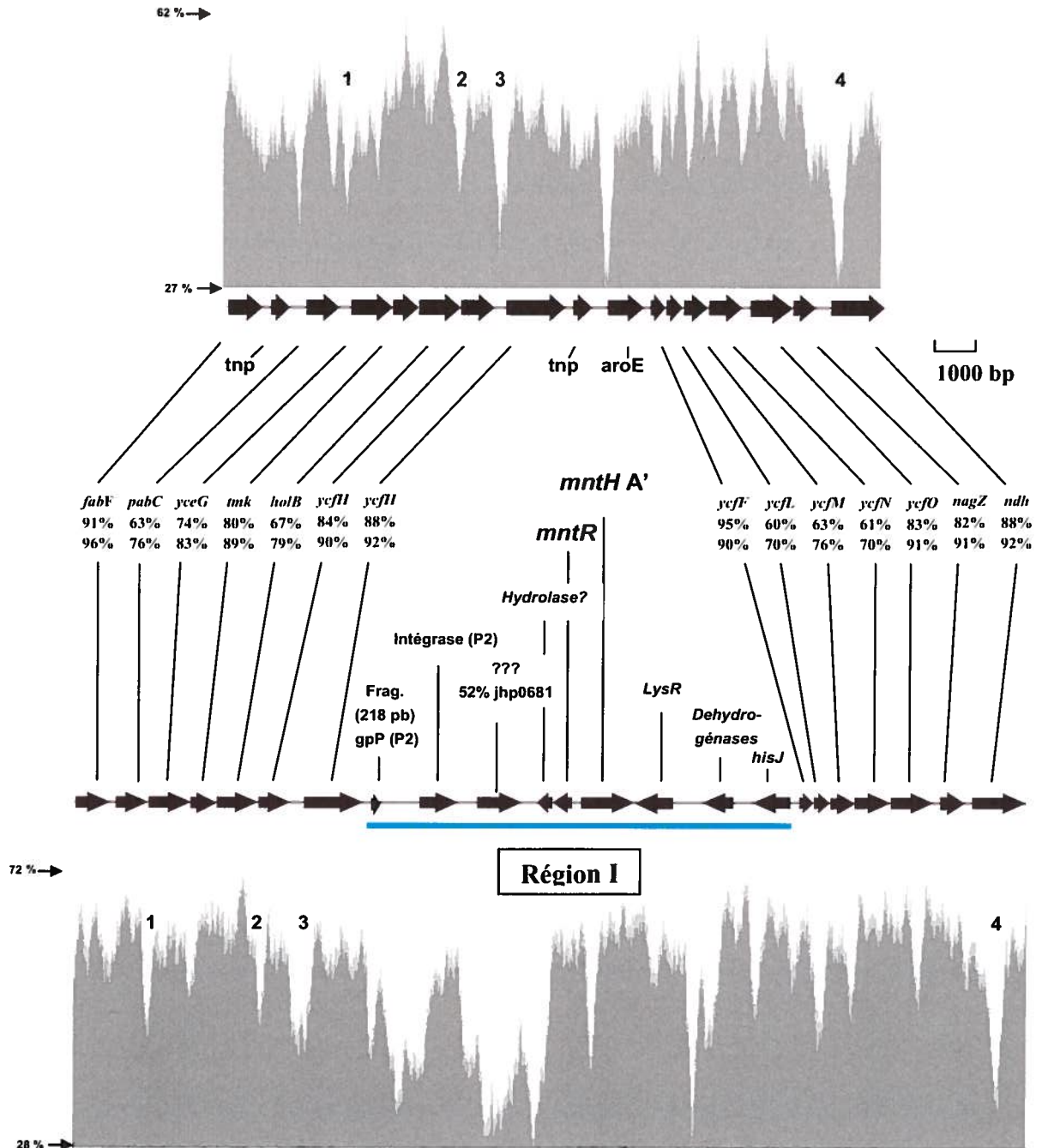
L'analyse, plus approfondie de la région I chez *Serratia marcescens*, nous amène un élément de confirmation. En effet cette région contient une intégrase de phage (Famille P2), ainsi qu'un fragment de 218 pb de la protéine GpP appartenant à un phage (Famille P2). De plus, comme on le voit sur la figure 12, la partie contenant ces deux gènes a un GC % qui est inférieur au reste du génome. La présence de fragments de génome de phages dans la région I est un élément qui nous permet de supporter l'hypothèse d'un transfert horizontal de la partie I. En effet, les phages sont très importants dans les phénomènes de THG comme il a été décrit dans la partie revue de littérature, de plus la colocation de gènes C $\beta$  avec des éléments facilitant les transferts horizontaux (tRNA, séquences d'insertion) ont déjà été observés (Richer, Courville et al. 2003). Un autre élément qui indique un possible transfert horizontal de la région I est que les gènes que l'on y retrouve ne sont pas présents, pour la plupart, chez les  $\gamma$ -protéobactéries. Le protéine SmarA' en est un exemple. Un autre exemple est le gène que l'on retrouve à droite de l'intégrase de phage, code pour une protéine de fonction inconnue. Cette protéine a 46 % de similarité avec les protéines jhp0681 de la bactérie *Helicobacter pylori* J99, PBPRA0891 de *Photobacterium profundum* SS9, et de CJE0670 de *Campylobacter jejuni* RM1221. Ces espèces sont phylogénétiquement éloignées des  $\gamma$ -protéobactéries. De plus, on retrouve un gène qui code pour un transporteur de type ABC. On retrouve ce gène chez *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica SCR11043

(ECA2157), *P. syringae*, *A. tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*. Il ne semble pas y avoir d'équivalent chez des espèces comme *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Y. pestis*. Il a déjà été observé que ce gène a probablement été acquis par *Erwinia carotovora* par transfert horizontal (Bell, Sebaihia et al. 2004).

**Figure 12. Analyse de la région du génome de *S. marcescens* contenant *mntH A'*.**

Représentation schématique de la région de *S. marcescens* db11, contenant les gènes *mntR* et *mntHA'*, et comparaison avec la région colinéaire chez *Y. pestis* CO92. Les gènes de *S. marcescens* ont été identifiés en utilisant le programme BlastX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Les gènes, représentés par des flèches, sont nommés au centre de la figure et le pourcentage de similarité, suivi du pourcentage d'identité, des séquences protéiques correspondantes sont aussi indiqués en dessous. Ces pourcentages ont été déterminés en utilisant le programme « BlastP Two Sequences » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). La région de *S. marcescens* contenant les gènes n'ayant pas d'homologie avec ceux de *Y. pestis*, est soulignée. Cette région est appelée région I dans le texte. Cette figure contient aussi une analyse du pourcentage de GC des deux régions génomiques correspondantes. Cette analyse a été faite à l'aide du logiciel VectorNTI Suite 7.0 (Informax, Bethesda, MD), paramètre 200 nucléotides. Quatre diminutions du pourcentage de GC, numérotées de 1 à 4, sont observées. De plus, on observe dans le génome de *S. marcescens*, une diminution dans la région correspondante aux gènes de l'intégrase et de l'homologue de *jhp0681*.

*Yersinia pestis* CO92



*Serratia marcescens* strain Db11



#### 4.6 Organisation des gènes *mntR* et *mntH* en opéron et prédiction de l'affinité des protéines MntR

Dans les parties précédentes, il a été caractérisé différentes protéines MntH. De plus, certaines indications d'un transfert horizontal des gènes *mntR-mntHA'* dans le génome de *S. marcescens*, ont été présentées. La figure 13-A représente un alignement de quelques protéines MntR provenant de différentes espèces. Cet alignement a été effectué avec le logiciel VectorNTI. La première observation que l'on peut faire sur cet alignement est que la protéine MntR (codée par la région 1, figure 12) de *S. marcescens* est différente de celle que l'on retrouve chez *E. coli*, *S. Typhimurium* ou *K. pneumoniae*, espèce appartenant elles aussi aux  $\gamma$ -protéobactéries. On remarque que toutes les protéines MntR présentes dans cet alignement (en particulier celles des *Xanthomonas*) ont toutes le motif EXXEH, qui a été décrit comme déterminant dans le choix du métal co-répresseur (Guedon et Helmann 2003).

*S. marcescens* n'est pas la seule bactérie à posséder dans son génome les gènes *mntR* et *mntH* organisés en opéron inverse. La figure 13-B présente les espèces connues à ce jour, ayant une organisation en opéron des gènes *mntH-mntR*. Hormis *S. marcescens* dont le gène *mntH* code pour une protéine de groupe A', toutes les espèces, ayant une telle organisation, ont un gène *mntH* qui code pour une protéine du groupe C $\alpha$  (Richer, Courville et al. 2003). De plus, les espèces dont les génomes ont été séquencés, du genre *Xanthomonas* (hormis *malthophilia*) ou *Xylella*, ont un gène codant pour une Cytosine/Adénosine Déaminase (CumB), qui pourrait appartenir au même opéron, et être transcrit sur le même ARNm que *mntR*.

**Figure 13. Analyse des séquences des protéines MntR de certaines  $\alpha$  et  $\gamma$ -protéobactéries et de *B. subtilis* (A) et représentation schématique des loci, identifiés à ce jour, possédant les gènes *mntR* et *mntH* (B).**

A) Alignement à l'aide du logiciel VectorNTI Suite 7.0 (Informax, Bethesda, MD), des séquences MntR de *Bacillus subtilis* (*Bsub* : gi : 16079508), *Serratia marcescens* db11 (Sanger Institute, génome non-publié), *Gluconobacter oxydans* (*Goxy* : 58002910), *Mesorhizobium loti* MAFF303099 (*Mlot* : 14023008), *Magnetospirillum magnetotacticum* MS-1 (*Mmag* : 46202768), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. 8004 (*Xcam* : 66768269), *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 (*Xaxo* : 21242781) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (*Xory* : 58581829), *Xylella fastidiosa* 9a5c (*Xfas* : 15837615), *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* (Sanger Institute, génome non-publié), *Salmonella* Typhimurium (*Styp* : 54041563) *Escherichia coli* K12 (*Ecol* : 1787038) *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578 (NCBI génome non-publié). De plus, on retrouve à la position 10 un acide aspartique (D), à la position 102 un acide glutamique et finalement à la position 105 un acide glutamique (E) suivi d'une histidine (H) (encadrés sur le schéma). Ceci permet de prédire une affinité plus forte pour le manganèse que pour le fer (Guedon et Helmann 2003).

B) Représentation schématique des opérons supposés *mntR-mntH*, et s'il y a lieu des gènes pouvant aussi appartenir à ces opérons. Cette organisation a été identifiée seulement chez les espèces nommées dans cette figure. Cependant, tout les génomes bactériens ne sont pas séquencés.

A)

```

Bsub -----MTPPSMEDYIEGKRYMIEEKGYARVSDIAMALAVIIPSSVTAMVQKIDKDEYLIYEKYRG
Smar MVTRAPDNADRP-----AQTDMPEAEHIALRFSRARELAQSNALEIDYVELIADILQSTRREARTTDTARRFGVSHPTAIKNTARLKSAGLIVESRPYRG
Goxy MERARRLRDITAP-----KETLPDVEITHIEGFRANREARRNVLVLDYVELISDILLSEGGQARQVDIAGRLGVQOPTVAKMLAPLATEGYVTQXPYRG
Mlot MALZNRSVPRE-----PLPDADVISEGFRQQRARRSALVLDYVELIADILIEDGNEARQVDIARLGVQOPTVAKMLTRLCADGLVSRXPYRG
Mmag MQEASRDITGQEPAREPGRAGVDAPLFDALVHVESFRQAREARRLELVLDYVELIADILGDDGEARQVDIARLGVQOPTVAKMLKRLAEDGLVQQRPYRG
Xcam -----MGKSE-----KLDASAPVLIIDAQVHVESFRQVREARRAELVLDYVELISDILLVDGGEARQVDIARLGVQOPTVAKMLKRLVDRGQVVRPYRG
Xaxo -----MEAAAAPVLIIDAQVHVESFRQVREARRAELVLDYVELISDILLVDGGEARQVDIARLGVQOPTVAKMLKRLVDRGQVVRPYRG
Xory -----VGKSE-----KMEAAAAPVLIIDAQVHVESFRQVQARRAELVLDYVELISDILLVDGGEARQVDIARLGVQOPTVAKMLKRLVDRGQVVRPYRG
Xfas MNTKHNIPKHE-----NTQTQTAPLIDAKIHVASEFRQVRQARRDELIDYVELISDILLADSGQARQVDIAAHLGVQOPTVAKMLKRLARDGWVQRPYRG
Smar VGKTDSDSTSLK-----STPPIFAHRQVESFRQVREARRHMLVLDYVELISDILLADGGEARQVDIATRLGVQOPTVAKMLKRLARDGWVQRPYRG
Styp MGRKAGTPTTK-----KVTQILNVEEHVEGFRQVREARRRELIDYVELISDILLIIVGGEARQVDIAARLGVQOPTVAKMLKRLARDGWVQRPYRG
Ecol MSRPAGTPTAK-----KVTQILNVEEHVEGFRQVREARRRELIDYVELISDILLIIVGGEARQVDIAARLGVQOPTVAKMLKRLATMGLIEMIPARG
Kpnc MNRKAGKPTTK-----KVTQILNVEEHVEGFRQVREARRRELIDYVELISDILLIIVGGEARQVDIAARLGVQOPTVAKMLKRLASVGLIEMIPARG
M R LIDAE HVE FRQVREARR ELVLDYVELISDILL DCGEARQVDIARLGVQOPTVAKHLKRLA DGWV QRYPYRG
    
```

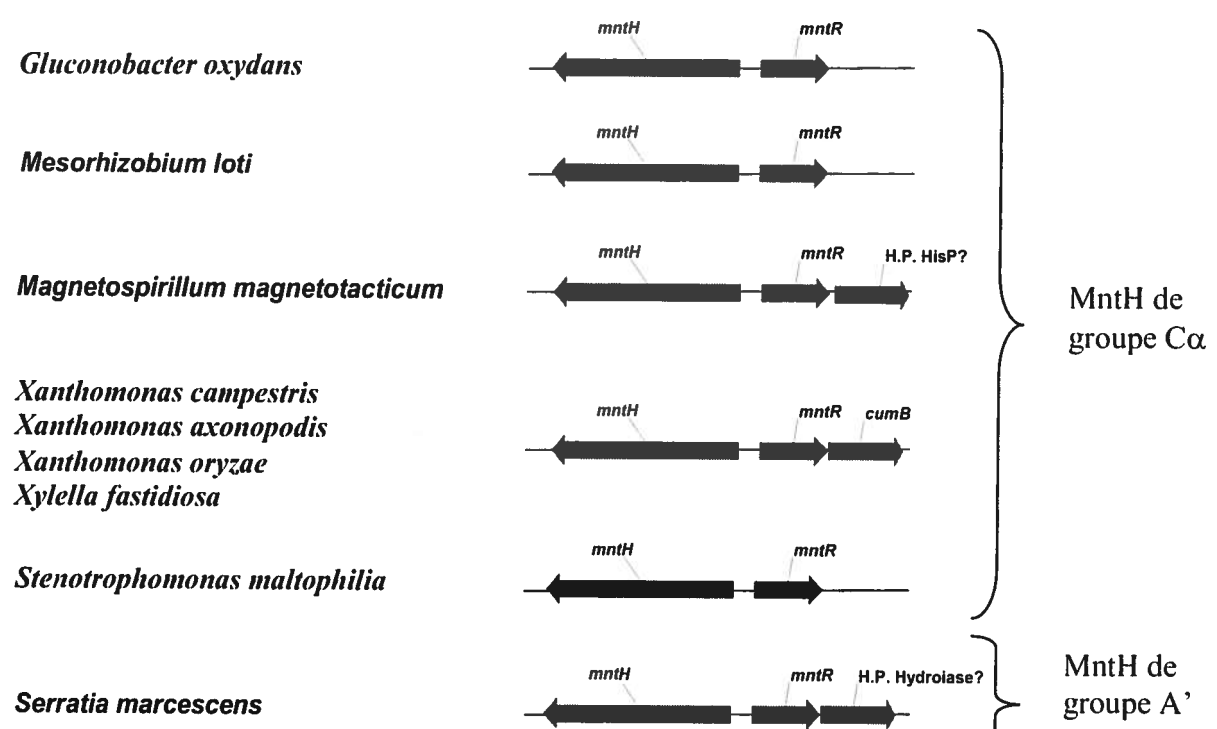
D

```

Bsub IVDTSKPKKCKRRLVYRHEILLQFIRIIGVDEEKIYNVEGTEHILSWNEIDRIGDLYQYFEEDDARKDKDKSIQKTEHHNQ
Smar VFLTFEEQQLAQKVRRRIRIVVDIIFCLGVPSETAELIDEGTEHITSEETLAVFEHYLQQHVKP-----
Goxy VFLTFPAGQDMADRARHRRIRIVEAFILALGVSEENARVDAEGTEHIVGSETLTLFEKALRGNIKQFMQALPDA-----
Mlot VFLTFPARKVAEESRIKQITVEAFIRLGVSAETARIDAEGETEHVSAETLEAFERKANTAPR-----
Mmag VFLTFPAGQALAEQSRERIRIVERFLCALGVSRRETARRDAEGTEHIVSAETLDAFRFPADAKI-----
Xcam VFLTFPASEALAAASSQRQIQIVERFLALGIDEATARRDAEGTEHIVSEATVAFAAFIERQGNSTP-----
Xaxo VFLTFPAGCALAAASSQRQIQIVERFLALGIDEATARRDAEGTEHIVSEATVAFAAFIDRQGGSAT-----
Xory VFLTFPASEALAAASSQRQIQIVERFLALGIDEATARRDAEGTEHIVSEATVAFAAFIDRQGGSAT-----
Xfas TFLTFPASKALAAASRECIQIVERFLALGIDATARRDAEGTEHIVSEATVAFAAFIETQRHSPTT-----
Smar VFLTFPESEALAHASQRQIQIVERFLALGVDAETARRDAEGTEHIVSEQLLAFEFVKAEGGAP-----
Styp VFLTFPESEKLAQESRERIQIVENFLVLEVSPEIARRDAEGTEHIVSQETLDAFLAFTQQHGTSAE-----
Ecol VFLTFPESEKLAQESRERIQIVENFLVLEVSPEIARRDAEGTEHIVSEETLDAFRLETQKHGAK-----
Kpnc IFLTFPESEKLAQESRERIQIVENFLAIVSAEIAARRDAEGTEHIVSEETLAFLEKFTQTCGSSQ-----
VFLTFPAGEIASRRHQIVEFLALGVETARRDAEGTEHIVSEETLAAFEL
    
```

E EH

B)



#### 4.7 Étude d'un gène *mntHCα* dans un contexte endogène.

##### 4.7.1 Construction de trois mutants *Xanthomonas campestris* pv *campestris* *mntR* (R), *mntH* (H) et *mntR-mntH* (RH).

En parallèle de la caractérisation des homologues MntH du groupe A et C dans *E. coli* ou *S. Typhimurium*, il est apparu intéressant d'étudier une protéine MntH de groupe C, dans son contexte endogène. Notre choix s'est arrêté sur la bactérie *X. campestris* pv *campestris*, car cette bactérie est une  $\gamma$ -protéobactérie (comme *E. coli*, *S. Typhimurium*). De plus, son gène *mntH* est organisé en opéron avec son répresseur *mntR*. Cette organisation est conservée avec d'autres bactéries et certaines indications laissent penser à une acquisition de ces gènes par transfert horizontal (Richer, Courville et al. 2003). Ceci nous a amené à vérifier si le régulateur MntR contrôle l'expression du gène *mntH* adjacent. De plus, nous avons aussi choisi cette bactérie car MntH semble être le seul transporteur de manganèse connu. La protéine MntH de *X. campestris*, exprimée dans *E. coli*, montre des signes de transport de cadmium et de cobalt ainsi que de protons en présence de cadmium et de différents métaux (Veyrier, Castillo et al. 2004). Malgré que la protéine soit dégradée au fil du temps, elle complémente les phénotypes du mutants M2S, au même titre que la protéine de *S. Typhimurium*. Il semble donc que des propriétés de transport soient conservées dans le cas de cette protéine MntH de groupe C. Mais, quels rôles joue réellement cette protéine dans *X. campestris* ?

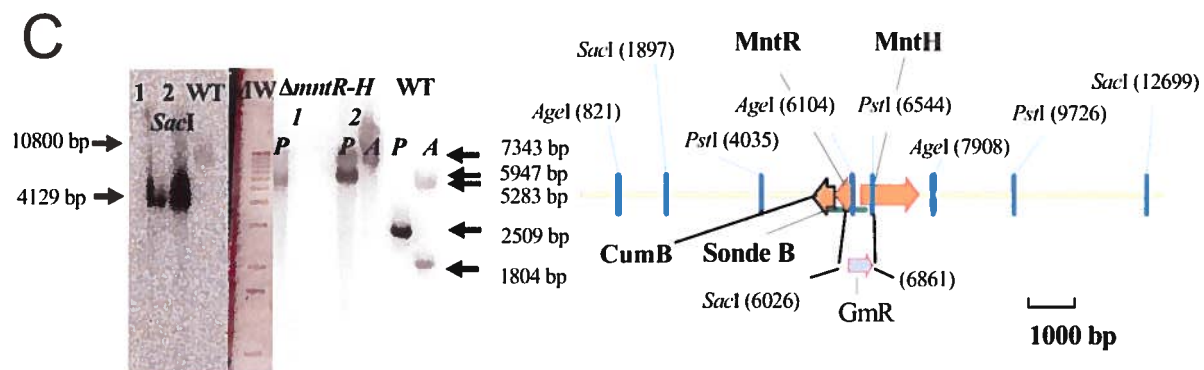
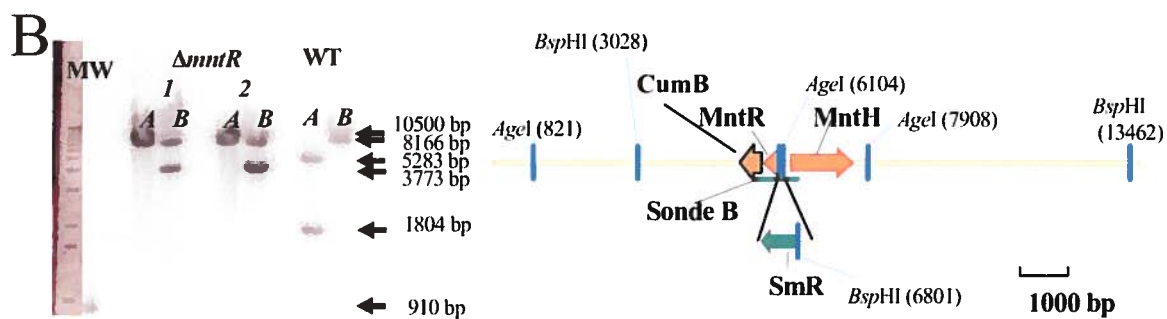
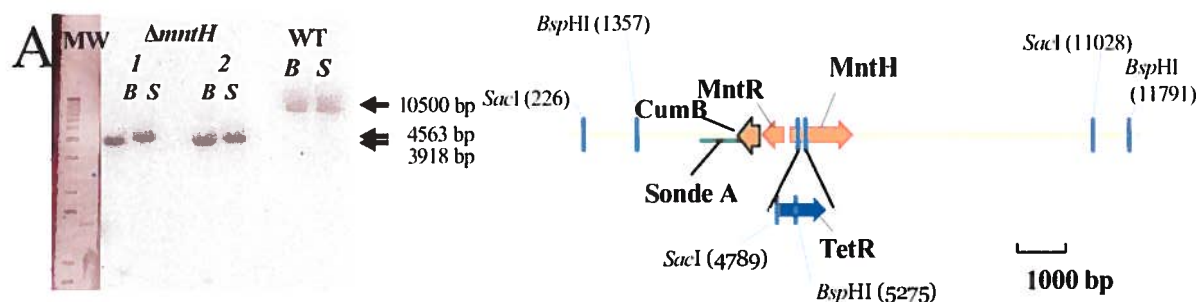
Pour répondre à cette question, nous avons construit différents mutants en remplaçant un fragment du gène à muter par une cassette de résistance à un antibiotique. La partie droite de la figure 14 présente une schématisation des insertions des cassettes de résistance aux antibiotiques, dans le cas des trois constructions. La figure 14-A présente les résultats des digestions, par les enzymes *BspHI* (B) et *SacI* (S), des ADN génomiques de *X. campestris* et de deux mutants *mntH* indépendants et hybridés à la sonde radioactive A. On obtient respectivement des fragments de 3918 pb et 4563 pb pour les mutants *mntH*, alors que dans le cas de l'ADN de la souche sauvage, on obtient des bandes de tailles d'environ 10500 pb. Ces tailles sont celle attendues, comme il est schématisé sur la partie droite de la figure 14-A. De même, les ADN génomiques des deux mutants *mntR*

(figure 14-B) ont été digérés par *AgeI* et *BspHI* et hybridés à la sonde radioactive B. Lors de la digestion par *AgeI*, on obtient des fragments de 8166 pb pour les mutants et deux fragments de 5283 et 1804 pb pour la souche sauvage. Lors de la digestion par *BspHI*, on obtient deux fragments de 8166 et 3773 pb, pour les mutants *mntR*, alors que dans le cas de l'ADN de la souche sauvage, on obtient un fragment d'environ 10500 pb. Ces tailles sont les tailles attendues comme schématisé sur la partie droite de la figure 14-B. Enfin, les ADN génomiques des deux mutants *mntR-mntH* (figure 14-C) ont été digérés par *SacI*, *PstI* et *AgeI* et hybridés à la sonde radioactive B. Lors de la digestion par *SacI*, on obtient un fragment de 4129 pb pour les mutants et un fragment de 10800 pb pour la souche sauvage. Lors de la digestion par *PstI* on obtient un fragment de 5947 pb pour les mutants *mntR-H* et 2509 pb pour la souche sauvage. Lors de la digestion par *AgeI*, du mutants *mntR-H* clone 2, on obtient un fragment de 7343 pb, alors que dans le cas de l'ADN de la souche sauvage on obtient deux fragments d'environ 1804 et 5283 pb. Ces tailles sont celles attendues comme schématisé sur la partie de droite de la figure 14-C.

La construction des mutants *X. campestris mntH*, *mntR* et *mntR-H*, a fonctionné comme attendue. Les gènes ne semblent donc pas essentiels dans les conditions utilisées.

**Figure 14. Vérification, par buvardage de type Southern, des délétions géniques des trois mutants *X. campestris mntH* (H) (A), *mntR-mntH* (RH) (B) et *mntR* (R) (C).**

Les mutants générés, à l'aide des variants du plasmide pK18mobsacB, ont effectué une double recombinaison homologue, ayant comme conséquence le remplacement d'un fragment du gène à muter par une cassette de résistance à un antibiotique. La partie droite de la figure 14 présente une représentation schématique des insertions des cassettes de résistance dans le cas des trois constructions. Pour générer le mutant *mntH* nous avons utilisé le plasmide pK18-MntH (Tet). Pour *mntR* nous avons utilisé le plasmide pK18-MntR (Sm) et enfin, pour générer les mutants *mntR-mntH* nous avons utilisé le plasmide pK18-MntR-H (Gm). Les ADN génomiques, de deux clones indépendants de chaque mutant, ont été digérés. Les profils de digestion ont été analysés par buvardage de type Southern, et comparés à ceux de la souche sauvage. **A)** Profils de digestion, par les enzymes *Bsp*HI (B) et *Sac*I (S), des ADN génomiques des mutants *mntH* ::Tet comparés à ceux de la souche sauvage (WT). **B)** Profils de digestion, par les enzymes *Age*I (A) et *Bsp*HI (B), des ADN génomiques des mutants *mntH-R* ::Gm comparés à ceux de la souche sauvage (WT). **C)** Profils de digestion, par les enzymes *Sac*I *Pst*I (P) et *Age*I (A), des ADN génomiques des mutants *mntR* ::Sm comparés à ceux de la souche sauvage (WT).



#### 4.7.2 Défaut de croissance du mutant *X. campestris mntH-R* et augmentation de ce défaut par le plasmide pCRH

Après avoir généré et vérifié les différents mutants *X. campestris*, le premier phénotype à observer était la croissance en milieu riche. Les courbes de croissance de la souche sauvage, des trois mutants et du mutant *mntR-mntH* portant le plasmide pCRH (*cumB-mntR-mntH*) sont présentées sur la figure 15-A.

On observe que les mutants *mntH* et *mntR* ne montrent pas de retard de croissance significatif, contrairement aux mutants *mntR-H*. Ce retard est visible dès le début de la phase exponentielle. En effet, à 8h, les cultures des mutants *mntR-H* ont une  $DO_{600}$  environ inférieure de moitié à celle de la souche sauvage (0,475 unité de DO pour les mutants *mntR-mntH* contre 0,775 pour la souche sauvage, 0,870 pour les mutants *mntH* et 0,824 pour les mutants *mntR*). Comme on le remarque, les cultures des mutants *mntR-H* atteignent la phase stationnaire après environ 30h, ce qui se traduit par un plateau à une  $DO_{600}$  de 1,6 comparativement à la souche sauvage (2,10), aux mutants *mntH* (1,90) et aux mutants *mntR* (2,04). Il est donc clair que les mutants *mntR-mntH* ont un retard de croissance.

Très singulièrement, l'opéron *cumB-mntR-mntH*, introduit via pCRH dans le mutants *mntR-H*, ne complémente pas ce défaut de croissance mais au contraire l'augmente significativement. En effet, la croissance à 8 h est diminuée d'environ deux tiers ( $DO_{600}$  0,289). De plus après 48h, ces cultures ne semblent pas encore avoir atteint la phase stationnaire et la  $DO_{600}$  de 1,06 est environ inférieure de moitié à celle de la souche sauvage et d'un tiers à celle du mutant *mntR-H* ne portant pas le plasmide pCRH. Les souches *mntR-mntH* ont bien un retard de croissance. Et singulièrement, l'introduction des gènes *cumB-mntR-mntH* dans ces souches augmente ce défaut.



#### 4.7.3 Sensibilité aux peroxydes des mutants *X. campestris*

Les molécules provoquant un stress de type peroxyde testées (figure 15-B) sont : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le tert-butyl hydroperoxyde (t-BOOH), un modèle de peroxyde organique (ROOH). La délétion du gène *mntH* entraîne une augmentation de la sensibilité au t-BOOH et à l' $H_2O_2$  (diamètre d'inhibition de croissance respectivement égaux à 4,8 et 2,5 cm), en comparaison avec les sensibilités de la souche sauvage (respectivement 3,5 et 1,8 cm). La mutation de l'opéron *mntR-H* a un effet surprenant en présence de t-BOOH. Les mutants *mntR-H* (2,5 cm) sont plus résistants à cette molécule que la souche sauvage (3,5 cm). De plus, ce phénotype est abrogé lorsque les mutants *mntR-H* portent les gènes *cumB-mntR-mntH*, via pCRH. La délétion du gène *mntR* ne semble pas affecter la sensibilité au t-BOOH. En effet, les mutants *mntR* présentent une zone de sensibilité de 3,6 cm, équivalente à celle de la souche sauvage. Cependant, celle-ci semble légèrement affecter la sensibilité à l' $H_2O_2$ , les mutants *mntR* présentant une zone d'inhibition de 2,0 cm. Celle-ci est légèrement plus importante que celle de la souche sauvage, cependant on retrouve cet écart à chaque fois que l'on refait l'expérience.

#### 4.7.4 Sensibilité à la ménadione des mutants *X. campestris*

La ménadione est un modèle souvent utilisé pour caractériser un stress de type anion super-oxyde. Nous avons donc testé le comportement des mutants face à ce composé (figure 15-B). La délétion du gène *mntH* ou du gène *mntR* ne semble pas affecter la sensibilité à la ménadione. Les mutants *mntR* (2,5 cm) et *mntH* (2,6 cm) ont des sensibilités qui sont similaires à celle de la souche sauvage (2,5 cm). Par contre, la délétion de l'opéron *mntR-mntH* affecte la sensibilité à la ménadione. Les mutants *mntR-H* (3,1 cm) ont une zone d'inhibition plus importante que celle de la souche sauvage. Cependant, lorsque les mutants *mntR-H* portent le plasmide pCRH (*cumB-mntR-mntH*), la zone d'inhibition (4 cm) est plus importante que celle des mutants ne portant pas le plasmide.

#### 4.7.5 Sensibilité aux métaux divalents ( $Mn^{2+}$ , $Cd^{2+}$ , $Cu^{2+}$ )

Afin d'être en mesure d'expliquer les effets des délétions sur la sensibilité aux différentes molécules oxydantes, il était nécessaire de vérifier les différences dans la sensibilité aux différents métaux, connus pour interagir avec MntH et MntR. Les résultats sont présentés dans la figure 15-C.

Le premier métal qui s'imposait était le manganèse. La mutation *mntR* augmente de manière significative (3,7 cm) la zone d'inhibition créée par la présence de manganèse, lorsque l'on compare celle-ci avec celle de la souche sauvage (2,0 cm). Mais cette sensibilité n'est pas diminuée lorsque l'on enlève aussi le gène *mntH* (mutant *mntR-H* 4,1 cm) et celle-ci est même plus importante que celle des simples mutants *mntR* ( $p < 0,05$ ). L'introduction du plasmide pCRH (*cumB-mntR-mntH*) dans le mutant *mntR-H* restaure une sensibilité au manganèse (2,1 cm) similaire à celle de la souche sauvage.

Les mutants ont un profil de sensibilité qui diffère de celui du manganèse, lorsqu'ils sont en présence de cadmium, à une concentration égale à 0,125 M. Les mutants *mntR-H* ont une sensibilité au cadmium inférieure à celle de la souche sauvage (respectivement 2,4 et 3,2 cm). De plus, l'introduction du plasmide pCRH dans les mutants *mntR-H*, entraîne une augmentation de la sensibilité (3,1 cm) des mutants *mntR-H*. Celle-ci devient alors similaire à celle de la souche sauvage.

Les différentes souches se comportent d'une façon similaire en présence de cuivre. La délétion du gène *mntR* augmente la zone d'inhibition créée par la présence de cuivre lorsque l'on compare avec la souche sauvage (respectivement 3,3 et 3,1 cm). Les doubles mutants *mntH-R* ont une sensibilité (de 2,6 cm) moins importante que celle des simples mutants *mntR*, ainsi que de celle de la souche sauvage. De plus, l'introduction du plasmide pCRH dans le mutant *mntR-H* restaure une sensibilité au cuivre de 3,1 cm égale à celle de la souche sauvage. Contrairement au manganèse, la délétion du gène *mntH* semble diminuer la sensibilité. On observe cette diminution lorsque l'on compare *mntH* (2,9 cm) avec la souche sauvage ou lorsque l'on compare la souche *mntR-H* avec *mntR*.

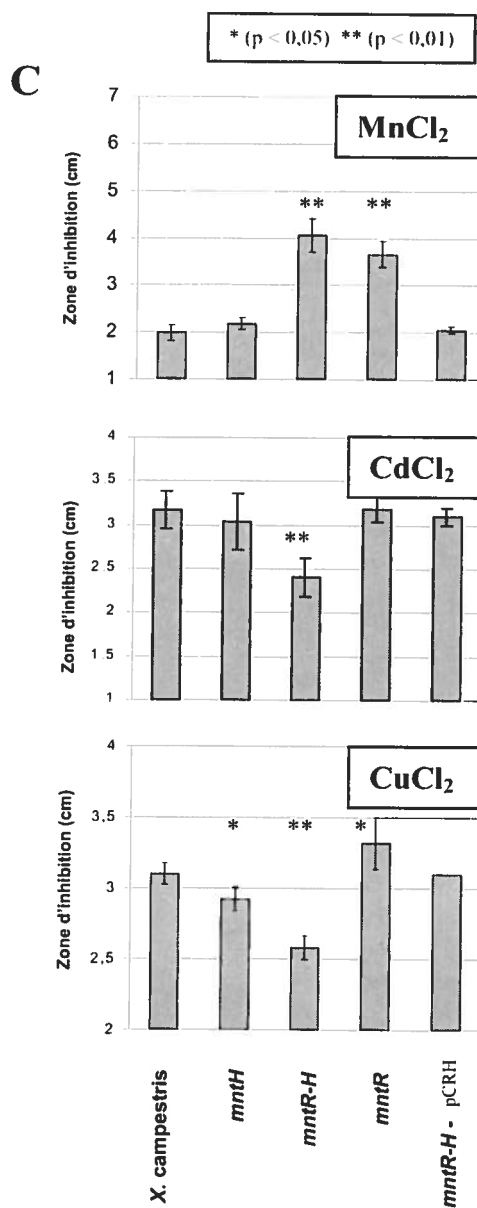
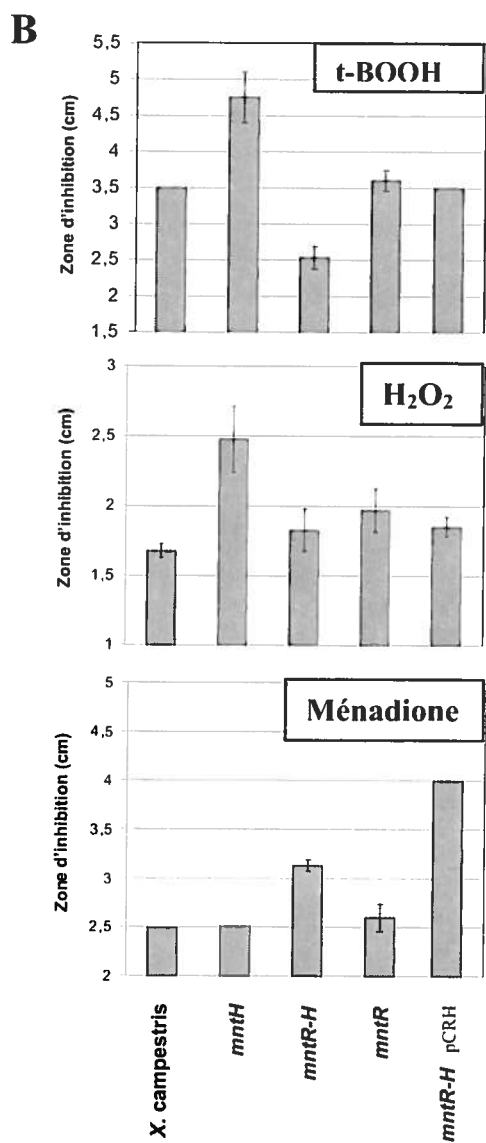
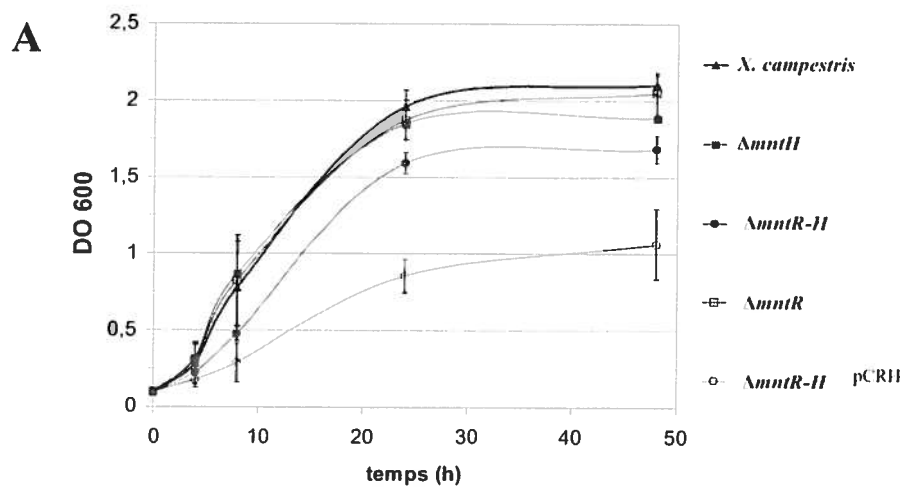
D'autres métaux ( $FeSO_4$  1M,  $CoCl_2$  0,25 M,  $ZnCl_2$  0,25M) ont été testés cependant, aucun phénotype significatif n'a pu être observé. En résumé, en comparaison avec la souche sauvage, les mutants *mntH* sont moins sensibles au cuivre. Les mutants

*mntR-H* sont hyper-sensibles au manganèse, mais résistants au cadmium et au cuivre. De plus, l'introduction du plasmide pCRH (*cumB-mntR-mntH*) complète bien ces sensibilités. Les mutants *mntR* sont plus sensibles au manganèse (moins que les mutants *mntR-H*) et plus sensibles au cuivre.

**Figure 15. Phénotypes des mutants *X. campestris*.**

La figure 15-A présente les courbes de croissance des mutants *X. campestris*, en milieu riche TYG. Des cultures fraîches ( $DO_{600}$  0,1) ont été incubées à 30°C, à une vitesse de 200 RPM et les  $DO_{600}$  ont été mesurées à différents temps. Deux expériences ont été faites en duplicata pour chacun des deux clones de chaque mutant. La figure 15-A présente les moyennes (8 valeurs par points) des densités optiques en fonction du temps incluant les résultats de la croissance du mutant *mntR-mntH* portant le plasmide pCRH. Ce plasmide a été construit tel que décrit dans la partie Matériel et Méthodes.

Les figures 15-B et 15-C présentent les moyennes des zones d'inhibition de croissance, mesurées par la méthode des tests de diffusion précédemment décrite (Mongkolsuk, Whangsuk et al. 2000). Deux clones indépendants de chaque mutant ont été testés. La figure 15-B présente les moyennes d'une expérience en duplicata, des sensibilités en présence de t-BOOH (0,5 M),  $H_2O_2$  (0,5 M) et de ménadione (1,5 M). Cependant, l'expérience a été faite au minimum trois fois et les mêmes profils ont été observés. La figure 15-C présente les moyennes, d'au minimum 3 expériences en duplicata, des sensibilités en présence de  $MnCl_2$  (1M),  $CdCl_2$  (0,125 M),  $CuCl_2$  (1 M).



## **5. DISCUSSION**

L'étude qui est présentée dans ce mémoire avait pour but de tester une hypothèse d'évolution fonctionnelle entre les différents groupes MntH (Richer, Courville et al. 2003), en testant, en particulier, les homologues des groupes A et C. Les différences et les similarités, entre les protéines MntH de groupe C et de groupe A, ont été observées en exprimant les représentants sélectionnés dans *E. coli* ou dans *S. Typhimurium*. Les résultats d'expression hétérologue permettent de comparer les homologues les uns aux autres, à condition qu'ils soient correctement produits par les entérobactéries utilisées. Pour déterminer le rôle physiologique d'un transporteur MntH de groupe Ca, démontrant une activité fonctionnelle dans les entérobactéries, le phyto-pathogène *X. campestris pv campestris* a été choisi pour vérifier l'importance du manganèse dans les interactions plantes-pathogènes. Nous avons tiré parti, du fait que les gènes *mntH* et *mntR* sont liés pour étudier aussi le rôle du régulateur MntR. Cette organisation est propre à une sous famille de gènes Ca qui pourraient se propager par transfert horizontal (Richer, Courville et al. 2003), ainsi qu'au gène *mntH* de groupe A' de *Serratia marcescens*. La présente étude fournit des indications que *S. marcescens* aurait acquis ces gènes *mntR* et *mntH* de groupe A' par transfert horizontal. La section qui suit a pour but de résumer et de discuter les résultats les plus importants obtenus lors de cette étude.

#### Expression et activité des différentes protéines MntH, dans *E. coli*.

Nous avons démontré que certains homologues MntH n'étaient pas exprimés, dans *E. coli*, au même taux que la protéine EcolA dans le système pBAD et les conditions choisies (figure 7). De plus, dans certains cas (NpunCa, PfluCγ, SmarA) l'absence d'expression a été corrélée à une absence d'activité dans *E. coli*. D'autres protéines peu ou pas exprimées, semblent avoir une bonne activité comme SmarA' et moindrement WbreCβ.

Les deux protéines de groupe C qui ont démontré les meilleurs taux d'expression et d'activité sont : SmutCβ et XcamCa. Il est quand même intéressant d'avoir un taux d'expression aussi important pour SmutCβ. En effet, la bactérie *Streptococcus mutans* est phylogénétiquement éloignée de *E. coli*. Une différence importante, entre SmutCβ et XcamCa, est la relative labilité de cette dernière qui a été corrélée à une activité

relativement moindre. Malgré une expression et une activité visibles, on remarque une diminution du taux de cette protéine après 10h ou 16h. Le fait que certaines protéines MntH puissent être dégradées, pourrait aussi expliquer l'absence d'expression/activité pour certaines protéines (comme SmarA, WbreC $\beta$ , NpuncC $\alpha$ , et PfuC $\gamma$ ). En effet, il est possible que celles-ci ne s'intègrent pas correctement dans la membrane et soient reconnues par certaines protéases de *E. coli* et soient dégradées rapidement. Il se peut que les protéines SmarA' et WbreC $\beta$ , soient dégradées mais pas suffisamment rapidement pour empêcher leur effet lors d'une expression continue.

Concernant l'activité des protéines fonctionnelles, nous pouvons remarquer des différences dans les affinités pour certains métaux. Cependant, la signification des résultats n'est pas établie car les protéines ont été exprimées dans un système hétérologue. Malheureusement, à part pour EcolA, les tests de sensibilités aux métaux ne permettent pas d'observer le transport du manganèse. Ce métal a été décrit comme le métal ayant le plus d'affinité avec les protéines MntH de *E. coli*, *S. Typhimurium*, et *B. subtilis*. Cependant, nous avons utilisé un autre test plus sensible pour la détection du transport de manganèse. Celui-ci consiste en une complémentation métallo-dépendante de la mutation *hflB1* thermosensible de la souche SL93 (Makui, Roig et al. 2000; Courville, Chaloupka et al. 2004; Chaloupka, Courville et al. 2005). Ce test nous a permis de démontrer un transport de manganèse dépendant de l'expression de EchrA, EcolA, XcamC $\alpha$  (par ordre d'efficacité).

Les résultats du transport de protons (figure 8) (Veyrier, Castillo et al. 2004), en fonction des différents homologues exprimés et des différents métaux présents dans le milieu, complètent les données obtenues par la méthode des tests de diffusion des métaux. En effet, il a été constaté un transport de protons pour la majorité des protéines, sauf pour SmarA, WbreC $\beta$ , NpunC $\alpha$ , et PfuC $\gamma$ . Ceci confirme que ces dernières n'ont que peu d'activité dans *E. coli*. Pour les autres nous avons démontré une entrée de protons en réponse au cadmium et à différents métaux (Veyrier, Castillo et al. 2004). Ceci permet donc d'établir une fonction conservée de symporteur métaux/protons pour toutes les protéines actives testées, ce qui représente un résultat tout à fait original. À long terme, ce test permettra de comparer le transport de H<sup>+</sup> en fonction des différents métaux (en



particulier du manganèse) et de compléter les résultats de la sensibilité aux métaux mesurée par les tests de diffusion.

Dans le cadre du projet visant à tester l'hypothèse d'évolution fonctionnelle entre les différents groupes phylogéniques de MntH (Courville, Chaloupka et al. 2004; Chaloupka, Courville et al. 2005), nous avons comparé l'importance de certains acides aminés, très conservés dans la famille des protéines MntH. Trois protéines, représentant les trois groupes de protéines MntH (EcolA, XcampC $\alpha$ , et CtepB), ont été modifiées par mutagenèse dirigée. L'acide aminé choisi est l'histidine conservée, en position respective 216, 238 et 214, dans les trois représentants des protéines MntH. Celle-ci a été remplacée soit par une alanine (A) soit par une arginine (R). La comparaison de l'effet des mutations, identiques pour les trois homologues de différents groupes, nous renseigne sur leur relation structure/fonction. Les différences observées entre les homologues, de groupe A, B et C testés, confirment l'importance fonctionnelle de cette histidine conservée dans le transport des métaux. Nos résultats sont en accord avec ceux déjà obtenus par d'autres études. Une étude avait démontré que ces mutations, dans la protéine Nramp2 (mammifère), entraînent une diminution du transport de fer et de cobalt, lorsque l'on remplace cette histidine par une alanine et de façon plus importante, lorsque celle-ci est remplacée par une arginine (Lam-Yuk-Tseung, Govoni et al. 2003). De plus, il a été suggéré une implication de cette histidine dans le transport de H<sup>+</sup> par Nramp2 (Lam-Yuk-Tseung, Govoni et al. 2003). Même si la mutation affecte la sensibilité aux métaux dans le cas des trois groupes, on observe certaines différences lorsque l'on compare les protéines non mutées avec leurs différents mutants. Par exemple, la sensibilité au zinc est plus affectée dans le cas des mutants EcolA que ceux de CtepB. La sensibilité au cobalt est plus affectée dans le cas des mutants EcolA que XcamC $\alpha$ , et n'est que peu affectée dans le cas des mutants CtepB. Ceci suggère que même si cette histidine est importante dans la fonction des protéines de la famille Nramp/MntH, son rôle dans la structure/fonction ou l'environnement autour de cet acide aminé, sont différents en fonction des groupes phylogéniques.

Une autre protéine mutante, disponible dans le laboratoire, a été utilisée. Il s'agit de la protéine MntH de *E. coli* dont l'acide aspartique en position 34 a été remplacé par

une glycine. Il a été démontré par buvardage de type Western que cette protéine (EcolA D34G), est exprimée à un taux similaire à celui de la protéine non mutée, et que celle-ci n'a plus d'activité de transport métaux/protons (Chaloupka, Courville et al. 2005). Cette protéine mutante, clonée dans pBAD, a été utilisée comme témoin négatif supplémentaire. La différence majeure avec l'autre témoin négatif (vecteur sans gène *mntH*), est qu'il y a expression d'une protéine non-fonctionnelle. Ceci permet donc d'exclure tout effet dû seulement à la présence d'une protéine, et non à un transport de métaux/protons.

### Complémentation du double mutant *S. Typhimurium* M2S.

Le but du projet était d'essayer de compléter différents phénotypes obtenus grâce à la délétion du gène *mntH* dans *S. Typhimurium*. Des travaux, effectués préalablement dans le laboratoire (Boyer, Bergevin et al. 2002), démontraient que la délétion du gène *mntH*, cumulée à celle de *sitA-D*, chez *S. Typhimurium* isolat Keller, entraînaient : - un défaut de croissance en milieu riche supplémenté de chélateur de métaux (DP, 2,2'-dipyridyl) - une sensibilité accrue à l' $H_2O_2$  - une virulence atténuée dans un modèle de cellules RAW264.7 *Nramp1*<sup>-/-</sup> et dans un modèle de souris *Nramp1*<sup>-/-</sup>. De plus, on observe dans les conditions testées, une diminution de la capacité d'acquisition du fer, modérée, et du manganèse, totale, en comparaison aux simples mutants ou à la souche sauvage. Deux autres phénotypes ont été obtenus durant la présente étude. Il a été montré que les mutants M2S (*mntH*, *sitAD*), avaient aussi une sensibilité accrue au t-BOOH, et que cette sensibilité était due, principalement, à la délétion du gène *mntH* et non à celle de *sitA-D*. Il a aussi été montré que les mutants M2S avaient une sensibilité accrue à la ménadione, et que celle-ci était due à la délétion *sitA-D*. Nous avons, entre autres, voulu vérifier si l'expression des homologues MntH, actifs dans *E. coli*, avait un effet sur ces phénotypes de sensibilité au stress oxydatif.

Tout d'abord, nous avons essayé de diminuer la sensibilité au t-BOOH du mutant M2S en sur-exprimant nos différentes protéines MntH, à l'aide du plasmide pBAD. Le t-BOOH est un peroxyde, malgré tout il a été observé des différences avec l' $H_2O_2$ . Sur le plan qualitatif, pour une dose inférieure l'effet du t-BOOH est supérieur à celui de l' $H_2O_2$ ,

et sur le plan qualitatif *mntH* semble jouer un plus grand rôle que *sitAD*. En effet, à dose plus faible, l'écart entre la souche sauvage et les mutants M2S est plus important dans le cas du t-BOOH que dans le cas de l' $H_2O_2$ . Nous avons donc comparé l'effet de la sur-expression de MntH en présence de t-BOOH avec l'effet en présence de ménadione.

Il a été montré, préalablement, que la sensibilité au t-BOOH peut être accentuée en présence de fer et peut être complétée par le manganèse, même en présence de fer. Au contraire, la sensibilité à la ménadione est augmentée légèrement en présence de manganèse et plus en présence de fer. On observe aussi que le manganèse ne semble pas protéger la bactérie en présence de fer et de ménadione. Donc, il se pourrait que les phénotypes soient reliés aux taux ou au ratio de métaux. Nous avons comparé l'effet de la sur-expression de MntH en présence de t-BOOH avec l'effet en présence de ménadione. On observe un effet protecteur de la protéine MntH en présence de t-BOOH, alors que sa sur-expression semble nocive en présence de ménadione. Ces différents effets sont dus à la fonction de la protéine MntH car, lorsque l'on sur-exprime EcolA D34G (ou pBAD24), ces effets ne sont pas observés.

Les protéines SmarA, et WbreC $\beta$  n'ont pas d'effet visible sur les phénotypes des mutants M2S. Cependant, l'expression de WbreC $\beta$ , augmente légèrement la sensibilité aux métaux de *E. coli*. Peut-être que WbreC $\beta$ , n'est pas suffisamment exprimée, alors que SmarA ne semble pas fonctionnelle. D'un autre côté, les protéines EcolA, et StypA, ont des effets du même ordre dans les deux cas. Ces résultats sont assez attendus car leurs séquences protéiques sont très proches et, exprimées dans *E. coli*, ces protéines montrent des expressions et des activités aux métaux semblables (mise à part pour la sensibilité au manganèse). Dans le cas de la protéine EchrA, on remarque un effet plus marqué que EcolA qui est peu significatif. Cependant, cet effet est aussi visible dans le cas de l'expression de cette protéine dans le système pKO35'*mntH3*'. Les protéines EchrA et EcolA ont des profils d'expression, de sensibilité aux métaux et de transport de protons, similaires sauf dans le cas du manganèse. En effet, l'expression de EcolA entraîne une légère augmentation de sensibilité au manganèse, contrairement à toutes les autres protéines. Malgré tout, EchrA complète la souche SL93. Il serait nécessaire de vérifier que ces protéines transportent la majorité des métaux de la même façon, et de mesurer de manière plus précise le transport de manganèse. Cela nous permettrait de

confirmer ou d'infirmer l'importance du manganèse dans la protection contre le t-BOOH. Dans le cas de la ménadione, les mutants M2S exprimant les trois protéines ont des sensibilités du même ordre. Cela confirme qu'un, ou plusieurs, autres métaux seraient impliqués, et que le manganèse ne semble pas important (seul métal qui diffère).

Les deux protéines SmarA et SmarA' proviennent de la même bactérie. Il est très curieux d'observer une activité pour SmarA' et pas pour SmarA. La protéine SmarA' semble avoir un effet protecteur contre le t-BOOH, similaire (voire supérieur dans le système pKO35'mntH3') à ceux des autres protéines du groupe A, mais son effet semble moindre en présence de ménadione. L'expression de SmarA' entraîne une sensibilité aux métaux et une entrée de protons, inférieures à EcolA. Il pourrait être intéressant de tester la complémentation de SL93 par la sur-expression de SmarA', et vérifier si SmarA' ne serait pas plus sélective au manganèse. Le fait que SmarA' entraîne une sensibilité inférieure à celle de la protéine EcolA, en présence de ménadione, est relativement attendu vu que la sur-expression de SmarA' entraîne globalement moins de sensibilité aux métaux.

Les protéines du groupe C XcampCa, et SmutC $\beta$  ont des effets du même ordre aux oxydants, mais semblent très différents vis-à-vis du transport des métaux. Ces protéines semblent avoir un effet moindre en présence de t-BOOH, et leur effet en présence de ménadione est du même ordre que ceux de SmarA'. Ceci peut sembler surprenant surtout pour la protéine SmutC $\beta$  qui a une expression importante, et surtout une activité de transport qui semblait supérieure ou égale à celle des protéines du groupe A. Cependant, SmutC $\beta$  ne complémente pas la souche SL93 et XcamC $\alpha$  complémente cette dernière mais de manière moins efficace que EcolA, ce qui implique le lien possible entre le manganèse et la résistance au t-BOOH.

La protéine CtepB ne montre aucun effet protecteur contre le t-BOOH, mais pourtant elle a un effet du même ordre que celle de EcolA vis-à-vis de la ménadione. Pour vérifier si cet effet était bien dû au transport de métaux via la protéine CtepB, nous avons fait les mêmes tests avec les mutants H214A, et H214R, pour lesquels nous avons préalablement observé une diminution de la sensibilité au fer et au cobalt. La mutation de l'histidine des mutants CtepB H214A (et plus visiblement H214R) diminue l'effet de CtepB en présence de ménadione. Ceci implique donc bien que l'un des métaux transporté par CtepB

entraîne une augmentation de sensibilité à la ménadione. Le fait que CtepB ne protège pas contre le t-BOOH est surprenant. Une des possibilités serait que la protéine CtepB ne transporte pas suffisamment de manganèse, mais trop d'autres métaux nocifs, pour apporter une protection contre le t-BOOH. Nous avons aussi observé que les mutants CtepB augmentent légèrement la sensibilité au t-BOOH, ceci est difficilement explicable dans l'état actuel. Cependant, il se pourrait que cela ne soit pas dû au transport. En effet, le mutant CtepB H214R ne semble pas montrer plus de sensibilité aux métaux et d'activité de transport de protons (résultats non montrés) que EcolA D34G.

L'étude en parallèle de la complémentation de la sensibilité à la ménadione et au t-BOOH des mutants M2S sur-exprimant un homologue, est intéressante mais ne permet pas de tirer de conclusions définitives. Ces phénotypes nous permettent de dégager des différences pour les protéines actives, qui devront être expliquées et confirmées par d'autres méthodes. Même si tout n'est pas encore compris, il semble imaginable que les taux de métaux ainsi que l'affinité des protéines puissent jouer un rôle dans la sensibilité au t-BOOH. Peut-être les protéines MntH, montrant un effet protecteur contre le t-BOOH, transportent assez de manganèse pour protéger, même si elles transportent aussi d'autres métaux redox actifs comme le fer, le cuivre (réaction de Fenton) ou le cadmium. Par exemple, le cadmium est un métal dont la toxicité semble être reliée à l'augmentation de l'effet d'un stress de type peroxyde organique chez *X. campestris* (Banjerdkij, Vattanaviboon et al. 2005). Il serait intéressant de vérifier, comme pour le fer, si le cadmium a un effet sur la sensibilité au t-BOOH des mutants M2S, et si l'effet est le même en présence de manganèse. Cependant, les méthodes utilisées, dans cette étude, pour mesurer le transport de manganèse ne sont pas suffisamment précises pour conclure définitivement. Dans le cas de la ménadione, le manganèse ne semble pas être le modulateur du phénotype et un ou plusieurs autres métaux sont probablement impliqués. En effet, le manganèse ne protégeant pas contre la ménadione, le fer ou les autres métaux à fort potentiel d'oxydoréduction, transportés par MntH, pourraient augmenter la sensibilité à ce composé.

Nous avons testé l'impact du manganèse dans la relation bactéries-macrophages (Veyrier, Castillo et al. 2004), illustré par les résultats de tests de pouvoir infectieux des souches *S. Typhimurium* M2S (pBAD ::MntH), dans le modèle de culture cellulaire de

type macrophage RAW 264.7 *Nramp1*<sup>-/-</sup> (Boyer, Bergevin et al. 2002). Avant l'infection, nous avons induit le gène *mntH* dans la souche M2S, pendant une heure, dans du milieu riche LB. Nous avons remarqué que les protéines MntH permettant la réplication intracellulaire du mutants M2S, sont EcolA, SmarA', XcamC $\alpha$ , et EchryA en incluant le témoin négatif EcolA D34G (réplication intracellulaire 2,5 fois supérieure à celle de M2S pBAD24). Ceci pourrait suggérer que seule la liaison du manganèse à MntH, à la surface des bactéries, pourrait entraîner une protection. Donc, pour tester les différents homologues dans un contexte infectieux en respectant la régulation normale du gène *mntH*, nous avons construit des plasmides pKO35'*mntH3*' qui portent la région génomique de *S. Typhimurium* entourant le gène *mntH* dont le cadre de lecture *mntH* a été remplacé par ceux de EchryA, SmarA', XcampC $\alpha$ , SmutC $\beta$ . Le test de sensibilité au t-BOOH, des mutants M2S exprimant ces constructions, permet d'observer une complémentation dans le cas de toutes les protéines, avec un ordre d'efficacité grossièrement le même que lorsque testé à l'aide des plasmides pBAD24 (EchryA>SmarA'>StypA>XcampC $\alpha$  > SmutC $\beta$ ). Cependant, l'efficacité diffère de la sur-expression induite dans le système pBAD en présence d'arabinose car, la transcription du gène *mntH* est activée en présence de peroxyde (possiblement via OxyR) (Kehres, Janakiraman et al. 2002), et réprimée par une régulation métallo-dépendante via Fur et MntR (Kehres, Janakiraman et al. 2002), ce qui diffère de pBAD.

Les tests de sensibilité au t-BOOH, des mutants M2S portant les plasmides pKO35'*mntH3*', montrent que les constructions permettent bien d'exprimer les homologues et qu'elles permettront de mener à bien le projet engagé. Ainsi, ces constructions (gène *mntH* de différentes espèces sous contrôle du promoteur de *mntH*) permettront d'introduire un allèle différent de *mntH* dans le génome des mutants M2S. Ensuite, les phénotypes de ces mutants pourront être étudiés dans un contexte infectieux, à l'aide de modèle murin, et il sera possible de comparer la virulence des différentes souches, par exemple en effectuant des études de compétitions. Nos résultats indiquent que toutes les protéines MntH testées sont des symporteurs métaux-protons, ayant des affinités aux métaux qui semblent différentes. Ces mutants nous permettront de vérifier si les protéines MntH de groupe C ou A' (transférées horizontalement) présentent un avantage dans un contexte infectieux.

### Organisation *mntR-mntH*, et transferts horizontaux.

En plus d'avoir observé le comportement de différentes protéines exprimées dans *E. coli* ou *S. Typhimurium*, nous avons détaillé aussi les différences dans l'organisation des gènes de bactéries possédant des gènes *mntH* Ca ou A'. Il a été observé que le gène *mntH* Ca est adjacent au régulateur *mntR* chez certaines bactéries (Richer, Courville et al. 2003). De plus, ce groupe de gènes a pu être acquis par transfert horizontal (Richer, Courville et al. 2003). Pour certains, l'organisation en orientation inverse autour d'une région promotrice, suggère un rôle dans la régulation (opéron). Le locus où est situé le gène *mntH* A' de *S. marcescens*, possède aussi la même organisation. Ceci conforte l'hypothèse que les gènes de groupe A' (A'1 et A'2) aient pu être transmis horizontalement récemment.

Le génome de *Serratia marcescens* souche db11 possède deux gènes *mntH*, un codant pour une protéine de groupe A, et un pour une protéine de groupe A'. Le génome de *S. marcescens* est pour l'instant le seul contenant deux gènes *mntH* dont l'un code pour une protéine de groupe A' et l'autre pour une protéine de groupe A. *S. marcescens* est une entérobactérie, proche de *Y. pestis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*. Il n'est donc pas surprenant qu'elle possède un gène de groupe A. De plus, les gènes que l'on retrouve aux alentours du gène *mntH* de groupe A (*nupC*, *glx*...) sont similaires à ceux de *Y. pestis*, *E. coli*, *S. Typhimurium* et le promoteur est aussi conservé. En effet, on retrouve la séquence consensus conservée de liaison au régulateur Fur (site Fur mais pas de site MntR). Le gène de groupe A a donc évolué de façon verticale.

Le gène de groupe A' est possiblement organisé en opéron inverse avec le gène *mntR*. On retrouve cette organisation dans d'autres espèces, mais dont le gène *mntH* est de groupe Ca (Richer, Courville et al. 2003). De plus, on retrouve le site de liaison à MntR dans la région promotrice. Cette organisation est donc le premier exemple d'une organisation *mntR-mntHA'*. La méthode utilisée pour détecter les indices de transfert horizontaux est la même que celle ayant servi aux autres gènes *mntH* Ca (Richer, Courville et al. 2003). En comparant le génome de *Y. pestis* et *S. marcescens*, on s'aperçoit que les gènes *mntR-mntHA'*, et plusieurs autres (région I), sont insérés dans une région du chromosome de *S. marcescens* qui est colinéaire avec celui de *Y. pestis*. Les gènes bordant la région I, dans

*S. marcescens*, ont une très forte homologie ainsi qu'une organisation similaire à ceux de *Y. pestis*. Au contraire, les gènes de la région I ne semblent pas être présents dans les entérobactéries séquencées, mis à part dans *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Son génome est très différent des autres entérobactéries. En effet, 33 % de ses gènes ne se retrouvent pas dans les autres entérobactéries et plusieurs indications d'acquisition de certains de ces gènes, par transferts horizontaux, ont été décrites (Bell, Sebahia et al. 2004). L'un des gènes que l'on retrouve dans la région I, est un composant d'un transporteur de la famille ABC. On retrouve aussi ce gène (ECA2157) chez *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, dans une région qui semble avoir été acquise horizontalement (Bell, Sebahia et al. 2004). Cette région (HIA8) transférée horizontalement, possède une centaine de gènes importants pour l'infection, dont certains codent pour des systèmes de sécrétion de type III, des protéines d'adhésion ou d'agglutination... (Bell, Sebahia et al. 2004). On retrouve aussi, dans la région I, un gène codant pour une intégrase et un fragment du gène gpP de phage probablement de la famille des phages P2. Ces éléments nous suggèrent que la région I a peut-être été acquise par transfert horizontal, probablement via un phage ou un autre élément mobile. Les protéines MntH de groupe A' semblent, pour l'instant, être reliées plus au groupe A qu'au groupe Cγ (Richer, Courville et al. 2004), mais celles-ci semblent moins répandues que les protéines des autres groupes. Il est donc très intéressant que la protéine SmarA' ait pu être récemment transférée horizontalement avec le gène *mntR*, ceci est analogue aux protéines *mntH* de groupe C.

Dans *E. coli* ou *S. Typhimurium*, la protéine SmarA ne semble pas transporter les métaux testés, alors que celle de groupe A' (SmarA') est active. En séquençant les gènes des protéines SmarA et SmarA', obtenus à partir de la souche 2170, nous nous sommes aperçus que les deux gènes avait 5 % de différence avec les gènes de la souche db11 (Institut Sanger). Ces différences se traduisaient par 8 changements d'acides aminés dans la séquence de la protéine SmarA ( $T_{db11}9P_{2170} = S_{EcolA}9$ , P11S = S10, I127V = V126, R156L = K155, F180L = L179, V223I = H222, Q286H = H285, H320R = R319), et un seul dans SmarA' (V418G = I402) (Appendice A). Ceci suggère une conservation plus importante de la protéine SmarA' entre les deux souches, qui pourrait être due à une pression sélective. Il a été démontré que XcamCα est active dans *E. coli* et dans



*Xanthomonas campestris*. Malgré tout, nous n'avons aucune certitude que dans *S. marcescens*, la protéine SmarA' soit plus fonctionnelle que SmarA, mais il pourrait être intéressant de le vérifier. De plus, la souche db11 séquencée et la souche que nous avons utilisée sont deux souches pathogènes. Cependant, celles-ci sont différentes, 2170 a été isolée de l'environnement et produit un pigment rouge (prodigiosine) (Suzuki, Uchiyama et al. 2001), alors que db11 a été isolée de la mouche drosophile et ne produit pas ce pigment (Flyg, Kenne et al. 1980). Il a été établi que la souche 2170 est plus virulente que db11 dans un modèle d'infection de nématodes (Kurz, Chauvet et al. 2003). Il serait utile de vérifier si le gène *smarA'* est présent dans toutes les souches de *S. marcescens*, et de comparer le taux de différences des séquences géniques et protéiques des gènes SmarA et SmarA' dans les différentes souches. Là aussi, une étude du rôle de ces deux protéines dans la bactérie d'origine pourrait être intéressante. Il pourrait être aussi intéressant de vérifier la fonctionnalité de l'opéron inverse supposé *mntR-mntHA'* dans *Xanthomonas campestris mntR-H*, pour prouver la fonctionnalité de celui-ci dans le cadre d'un transfert horizontal artificiel.

Comme nous venons de le voir, plusieurs indications font penser à un transfert horizontal de la région I de *S. marcescens*. Cette région contient les gènes *mntHA'*, et *mntR* organisés en orientation inverse. On retrouve aussi cette organisation dans d'autres espèces, dont le gène *mntH* est de groupe Ca (Richer, Courville et al. 2003), comme chez *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas oryzae*, *Xyllela fastidiosa* ( $\gamma$ -protéobactérie). On retrouve l'organisation *mntR-mntH* dans une région qui a été définie comme plastique dans *X. campestris*, c'est-à-dire une région qui est évolutive (acquisition de gène, déplacement) (da Silva, Ferro et al. 2002; Richer, Courville et al. 2003). Il semble aussi que, dans toutes ces espèces, le gène *cumB*, puisse aussi appartenir à l'opéron *mntR-mntH*. À noter, que ce gène est suivie par le gène *orn* qui lui, semble avoir son propre promoteur. On retrouve aussi cette organisation (*mntR-mntH*) dans *Stenotrophomonas* (ou *Xanthomonas*) *maltophilia*. Cependant, la position du gène *cumB* ne semble pas être conservé dans cette bactérie (Institut Sanger). En effet, on retrouve le gène *cumB*, suivie du gène *orn*, dans un autre locus. Le gène *cumB*, dans cette espèce, ne semble pas posséder de site de liaison à MntR. La possibilité que *cumB* puisse

être transcrit sur le même ARNm que *mntR*, dans *Xanthomonas campestris*, reste donc à vérifier. On retrouve aussi l'organisation *mntR-mntHC $\alpha$* , dans des espèces plus éloignées ( $\alpha$ -protéobactérie), qui présentent des séquences MntH très similaires, comme *Gluconobacter oxydans*, *Mesorhizobium loti*, *Magnetospirillum magnetotacticum*. Il est probable que cette organisation soit présente dans d'autres espèces, mais tous les génomes ne sont pas encore disponibles.

#### Effet des délétions géniques, sur la sensibilité aux métaux, de *X. campestris*.

L'expression hétérologue dans *E. coli* a permis d'identifier des protéines actives et de comparer l'impact de mutations identiques dans les protéines MntH de différents phylotypes. Cependant, le rôle physiologique de ces homologues ne peut être établi que dans le micro-organisme d'origine. Nous avons, pour cela, choisi l'agent phyto-pathogène *Xanthomonas campestris* pv *campestris* qui présentait, entre autres, l'avantage de pouvoir déterminer si *mntHC $\alpha$*  est sous le contrôle du répresseur MntR. Cependant, au vu des phénotypes, le gène *cumB* pourrait aussi appartenir à l'opéron *mntR-mntH* dans les *Xanthomonas* (mis à part *X. maltophilia*) et les *Xyllella*.

Nous avons donc construit trois mutants et un plasmide pCRH, qui a été introduit dans les mutant RH. À noter que ce plasmide porte également la région *cumB-mntR-mntH* du codon stop de *mntH* jusqu'à 90 pb après le codon stop de *cumB*.

Le phénotype indispensable à vérifier était la sensibilité des mutants vis-à-vis du manganèse. Des analyses de séquence des protéines de la famille MntR/DtxR, ainsi que des expériences de mutagenèse dirigée, ont montré que le motif EXXEH ainsi que l'acide aspartique (D) en début de protéine (figure 13-A), sont importants pour prévoir le métal cofacteur (fer versus manganèse) (Guedon et Helmann 2003). Comme on le remarque, que ce soit dans le cas de *E. coli*, *X. campestris* ou *S. marcescens*, la protéine MntR possède l'acide aspartique ainsi que le motif EXXEH (versus, pour le fer, un motif CXXEH et une méthionine à la place de l'acide aspartique) (Guedon et Helmann 2003). Ceci suggère que ces protéines MntR seraient bien des régulateurs dépendants du manganèse. Pour évaluer la sensibilité aux métaux, nous avons utilisé une méthode ayant

déjà été utilisée pour caractériser les mutants MntR de *Bacillus subtilis* (Que et Helmann 2000).

La première observation que l'on peut faire est que, comme dans *B. subtilis* (Que et Helmann 2000) et *S. aureus* (Horsburgh, Wharton et al. 2002), la seule délétion du gène *mntH* n'entraîne pas une diminution de sensibilité vis-à-vis du manganèse. Par contre, on observe que la délétion du gène *mntR* a pour effet d'augmenter la sensibilité vis-à-vis du manganèse, en comparaison à la souche sauvage, tout comme cela a été observé chez *B. subtilis* (Que et Helmann 2000), de même que chez *S. aureus* (Horsburgh, Wharton et al. 2002). Les résultats étaient attendus car MntR est un régulateur, pour l'instant, impliqué dans la répression des gènes des transporteurs de manganèse. Il est donc logique, qu'en absence d'une protéine MntR fonctionnelle, la sensibilité au manganèse augmente. En effet, on s'attend à une absence de répression dépendante du manganèse, via MntR, des systèmes de transport de manganèse, tel que MntH. Dans la partie introduction, trois types de transporteur de manganèse connus sont décrits à savoir, MntH, les transporteurs de manganèse de la famille ABC, et les systèmes de transport P-type ATPase. Des recherches par homologie de gènes codant pour de telles protéines (ABC, ou P-Type ATPase transportant le manganèse), n'ont pas donné de résultats dans le génome de *X. campestris*. À la différence de *B. subtilis* (Que et Helmann 2000) et *S. aureus* (Horsburgh, Wharton et al. 2002), qui ont un transporteur de manganèse de type ABC, il est fort probable qu'aucun autre transporteur de manganèse connu, ne soit présent dans le génome de *X. campestris*. En cumulant la mutation *mntH* à celle de *mntR* (mutants RH), il aurait été attendu d'observer une diminution de la sensibilité au manganèse, similaire à la souche sauvage (comme cela a été vu chez *B. subtilis* (Que et Helmann 2000)). Cependant, les mutants RH ne présentent pas une sensibilité équivalente à celle de la souche sauvage. L'existence d'autres protéines régulées par MntR, différentes de MntH, pourrait expliquer les sensibilités des mutants R et RH. Il serait nécessaire de vérifier si d'autres gènes ne seraient pas régulés par MntR dans *X. campestris*, comme un autre transporteur de manganèse ou un exporteur. Par exemple, il a été observé une activité de sortie de manganèse dans *S. Typhimurium* et *E. coli* (Kehres, Zaharik et al. 2000). Lorsque l'on remet des bactéries *S. Typhimurium*, préalablement incubées dans du milieu contenant du  $^{54}\text{Mn}^{2+}$ , dans un milieu frais, on

observe une sortie de 50 %  $^{54}\text{Mn}^{2+}$  en 10 min, et de 80 % lorsque ce milieu frais contient du  $\text{Mn}^{2+}$  (Kehres, Zaharik et al. 2000). En 2004, le même groupe avait proposé que la protéine YbiR soit un exporteur de manganèse. Cette protéine membranaire appartient à la famille ArsB/NhaD, qui code pour des perméases à différents anions. Le gène, codant pour cette protéine dans *E. coli*, semble être en opéron (même sens) avec le gène *mntR* (Kehres, Janakiraman et al. 2002). Cette équipe avait proposé une hypothèse de régulation positive d'une façon dépendante du manganèse via MntR des gènes *mntR* et *ybiR* (Kehres, Janakiraman et al. 2002). À ce jour, rien n'a été prouvé. De plus, il est peu probable que cette protéine soit un candidat, pour expliquer l'absence de diminution de la sensibilité des mutants RH en comparaison avec les mutants R, car *ybiR* n'est pas présent dans le génome des *Xanthomonas*. D'autres candidats pourraient aussi être suggérés, comme les protéines de la famille CDF (Cation Diffusion Facilitator). Il existe, par exemple chez *Saccharomyces cerevisiae*, des protéines de la famille CDF, qui confèrent une tolérance au manganèse (Delhaize, Kataoka et al. 2003). Donc, la présence d'un exporteur (ou d'un gène qui permettrait de résister au manganèse par exemple un chélateur) dans *X. campestris*, est envisageable, de même que la présence d'un transporteur de manganèse non connu.

Une autre observation que l'on peut faire est que la délétion du gène *mntH* ne diminue pas la sensibilité au manganèse. Cette délétion entraîne même une augmentation de la sensibilité du mutant *mntR-H* par rapport au mutant *mntR* ( $p < 0,05$ ) (complémentée par le plasmide pCRH contenant les gènes *cumB-mntR-mntH*). L'hypothèse la plus simple, serait que MntH puisse exporter du manganèse lors d'une forte augmentation intracellulaire. Ceci est thermodynamiquement possible d'après ce que l'on sait du mécanisme de transport de MntH. Dernièrement, les taux de certains métaux lors d'une infection par *M. tuberculosis* dans le phagosome ainsi que dans la bactérie, ont été mesurés (Wagner, Maser et al. 2005). Ce groupe de recherche a comparé la souche sauvage avec la souche dont le gène *mntH* (Mramp) a été supprimé et a remarqué une augmentation du taux de certains métaux à l'intérieur de la bactérie mutée en comparaison à la bactérie normale. Ces résultats semblent mettre en cause le fait que MntH soit seulement un transporteur facilitant l'entrée de métaux, et ce groupe a donc

émis l'hypothèse d'un export de métaux qui pourrait être médié par MntH (Wagner, Maser et al. 2005). De même, lorsque dans *S. aureus* la quantité globale de manganèse intracellulaire a été mesurée en fonction de certaines mutations, il a été montré que la mutation *mntH* ne diminue pas le taux de manganèse contrairement à MntA (transporteur de la famille ABC, équivalent de SitABCD), et la quantité intracellulaire de manganèse, du double mutant *mntA mntH*, est supérieure à celle du simple mutant *mntA* (Horsburgh, Wharton et al. 2002). Comme le promoteur de *mntH* de *X. campestris* contient un site conservé de liaison à MntR (Cellier, non-publié), il est fortement attendu que le mutant *mntR* sur-exprime MntH. L'effet de la double délétion *mntR-H* devrait donc, diminuer la sensibilité au manganèse. Est-il envisageable que MntH soit aussi capable d'exporter le manganèse dans certaines circonstances, comme lors d'une forte accumulation intracellulaire de ce métal ? Il est à noter que la sortie de métal, dépendante de MntH, n'est pas observée dans le cas d'autres métaux. Cependant, les mutants MntR ne sur-accumulent pas ces métaux là, contrairement au manganèse.

Dans la première partie, lors de la caractérisation, dans *E. coli*, de la protéine MntH de *X. campestris*, nous avons démontré une activité de transport de protons dépendant des métaux ainsi qu'une sensibilité accrue au cadmium et au cobalt, dépendante d'une protéine fonctionnelle. Comme on l'observe, la délétion des gènes *mntH-R* entraîne une résistance significative des mutants vis-à-vis du cadmium comparé à la souche sauvage, mais aussi aux mutants MntR. De plus, cette résistance est perdue lorsque l'on introduit, via pCRH, les gènes *cumB-mntR-mntH*. Ceci implique bien que MntH est importante pour faciliter l'entrée de cadmium. Les mêmes profils ont été observés avec le cuivre. On remarque que le mutant *mntR* est plus sensible au cuivre et le mutant *mntH* est plus résistant au cuivre, comparativement à la souche sauvage. On remarque aussi que le double mutant RH est beaucoup moins sensible au cuivre que le mutant R. Ces résultats suggèrent fortement un transport de cuivre et de cadmium via MntH et la répression de *mntH* par MntR et donc un rôle de XcamC $\alpha$  dans le transport de cations métalliques. Pour l'instant, il a été démontré un transport de cuivre par DCT1 (Nramp2) (Gunshin, Mackenzie et al. 1997) et par MntH de *S. Typhimurium* (Kehres, Zaharik et al. 2000), mais le cuivre n'est pas le métal ayant l'affinité la plus importante. Nous n'avons pas forcément regardé l'effet du cuivre lors de notre caractérisation des

différentes protéines MntH, mais il serait probablement intéressant de le faire. Par contre, le transport de cadmium par les protéines MntH/Nramp a été maintes fois prouvé (Chaloupka, Courville et al. 2005), y compris dans cette étude.

Il est raisonnable de croire que MntH transporte le cuivre et le cadmium. Cependant, le cadmium étant un métal à peu près aussi affine pour MntH que le manganèse, il est remarquable que le mutant MntR ne soit pas sensible au cadmium. Ceci implique donc d'autres acteurs. Le cuivre et le cadmium étant des métaux très toxiques, il existe de nombreux systèmes de défense comme des exporteurs. Par exemple, il existe certains homologues de systèmes connus d'export de métaux dans *X. campestris*. On peut citer notamment, le système dont fait partie CopA (export de cuivre), qui a été identifié dans le chromosome de *X. campestris* (Lee, Hendson et al. 1994), AcrD-CzcB (export de cuivre cadmium, zinc, cobalt) (Silver et Walderhaug 1992). Or, CopA, du moins dans *E. coli*, est sous le contrôle du métallo-régulateur CueR (famille MerR) (Outten, Outten et al. 2000; Stoyanov, Hobman et al. 2001). De même, le système CzcB est sous contrôle du métallo-régulateur CzcR dans *Ralstonia metallidurans* (Grosse, Anton et al. 2004). Il est possible que de tels systèmes d'export soient exprimés dans les mutants R et RH. Ceci expliquerait que le cadmium n'entraîne pas une sensibilité supérieure du mutant R, en comparaison à la souche sauvage (import dépendant de MntH compensé par un export). Cependant, ceci n'explique pas pourquoi on observe une résistance supérieure des mutants RH par rapport aux mutants H. MntR joue donc un rôle dans la résistance au cadmium et au cuivre. Il est possible qu'une forte concentration intracellulaire de manganèse dans *X. campestris* (causé par la perte de MntR) entraîne aussi indirectement une sortie de cuivre ou de cadmium. Par exemple, dans *E. coli* il a été démontré que le mutant *cueO* (cuivre oxydase), accumule plus de cuivre que la souche sauvage. De plus, cette accumulation peut être complétée par l'addition de 1 mM de manganèse, suggérant une sortie de cuivre en présence de forte concentration de manganèse (Tree, Kidd et al. 2005). Comme il est décrit dans l'introduction dans le cas des métallo-régulateur MntR et ArsR/SmtB, l'activation de tels régulateurs est fonction de l'affinité du métal mais aussi de sa disponibilité. Il pourrait être possible que certains régulateurs métallo-dépendants de systèmes d'export de cuivre et de cadmium, aient une affinité très faible pour le manganèse, mais que celle-ci soit compensée par une forte concentration

intracellulaire de manganèse que l'on retrouve dans le mutant R et RH. La sortie de cadmium et de cuivre pourrait être plus visible dans le mutant *mntR-H* car celui-ci ne pourrait plus compenser la sortie de métaux par une entrée via MntH.

Nous n'avons pas obtenu de phénotypes visibles concernant le cobalt, le fer, et le zinc. La majorité des protéines MntH sur-exprimées dans *E. coli* augmentent la sensibilité au fer, mais pas la protéine XcampCa. Il est donc attendu de ne pas voir d'effet significatif. Par contre, la sur-expression de la protéine XcampCa dans *E. coli* augmente la sensibilité au cobalt. Il est donc surprenant de ne pas voir d'effet significatif avec ce métal. Malgré tout, le fer et le cobalt étant hautement toxiques leur sortie et leur entrée sont hautement régulées. Donc, ceci n'exclut pas la possibilité d'un transport médié par MntH. Il est possible que la méthode de diffusion des métaux ne soit pas assez sensible. Il serait intéressant de mesurer, par exemple par spectroscopie de masse, les quantités de métaux intracellulaires et vérifier que ces sensibilités reflètent bien une accumulation intracellulaires dans la bactérie, et non une conséquence secondaire ou un effet croisé. Cependant, les sensibilités au manganèse, au fer, ainsi qu'au cadmium ont été corrélées avec une accumulation de ces métaux dans *E. coli* ou *S. Typhimurium* (isotopes radioactifs, ou spectroscopie de masse) (Makui, Roig et al. 2000; Boyer, Bergevin et al. 2002; Chaloupka, Courville et al. 2005).

Effet des délétions géniques sur la sensibilité aux oxydants de *X. campestris*.

Après avoir observé la sensibilité de nos différents mutants vis-à-vis des métaux, nous avons aussi tenté de caractériser leur comportement vis-à-vis de certaines molécules oxydantes. Concernant les phénotypes à l' $H_2O_2$  et au t-BOOH, comme dans le cas de *S. Typhimurium*, on observe que la délétion du gène *mntH* entraîne une augmentation de la sensibilité dans les deux cas. En rajoutant du manganèse dans le milieu, la sensibilité des mutants M2S au t-BOOH peut être complétée. L'ajout de manganèse protège aussi les mutants M2S de *S. Typhimurium* et les mutants *mntH* de *E. coli* contre l' $H_2O_2$  (Bergevin 2003). Ceci suggère fortement que l'import de manganèse dépendant de MntH protège contre les peroxydes. À noter que, comme dans *B. subtilis* (Que et Helmann 2000) et *S. aureus* (Horsburgh, Wharton et al. 2002), nous n'avons pas vu une diminution de la sensibilité au manganèse des mutants H en comparaison avec la souche sauvage. Cependant, nous regardions l'effet de la délétion du gène *mntH* en présence de fortes concentrations de manganèse (condition où le transport de manganèse n'est pas requis). Dans le cas des tests de sensibilité aux oxydants de type peroxyde, le manganèse était en concentrations standards. Il est donc normal de voir l'effet de MntH, car ce sont les conditions où *mntH* est activée tel que démontré dans *S. Typhimurium* (Kehres, Janakiraman et al. 2002) et *E. coli* (Bergevin 2003).

L'étude de la complémentation des phénotypes des mutants *S. Typhimurium* nous a permis d'émettre l'hypothèse que le manganèse protège contre les peroxydes. Nous avons montré que la mutation *mntR*, dans *X. campestris* entraîne une augmentation de la sensibilité au manganèse ce qui suggère une concentration intracellulaire élevée en manganèse (MntH indépendante). Il aurait été attendu de voir une résistance supplémentaire aux peroxydes. Or, nous avons observé une augmentation de sensibilité à l' $H_2O_2$ , et aucune différence en présence de t-BOOH. Malgré tout, on s'attend aussi à une forte expression de MntH (via une absence de répression due à l'absence de MntR et/ou une activation par les peroxydes). Le manganèse étant déjà présent, cette sur-expression peut entraîner un désavantage par le transport d'autres métaux redox-actif. De plus, comme nos résultats le suggèrent, en présence de forte concentration de manganèse, MntH semble permettre une sortie de manganèse accumulé à l'intérieur de la cellule.



Nous avons précédemment démontré que MntH transporte le cadmium et le cuivre. Or, le cadmium a déjà été montré comme hautement toxique en présence de peroxyde dans *X. campestris* (Banjerdkij, Vattanaviboon et al. 2005), et le cuivre et le fer sont eux aussi hautement toxiques (réaction de Fenton). On remarque que si on cumule la mutation de *mntR* avec la délétion du gène *mntH*, on obtient une hyper-résistance au t-BOOH. Ceci confirme que dans ce contexte (présence de manganèse) MntH peut entraîner un désavantage par le transport d'autres métaux. En effet, les mutants RH présentent, en plus d'une accumulation de manganèse, une diminution de la sensibilité au cadmium et au cuivre, et donc probablement une diminution des concentrations intracellulaires. Ils auraient donc certains avantages pour résister au t-BOOH (plus de manganèse moins de cadmium, et de cuivre). Malgré tout, ceci n'est qu'une possibilité et il faudrait des mesures plus spécifiques pour le démontrer.

Nous avons aussi testé les phénotypes de sensibilité à la ménadione. Cette molécule, est un analogue de la vitamine K, de la famille des quinones. Elle est souvent utilisée comme composé induisant un stress de type anion super-oxyde. Le mécanisme par lequel elle génère des anions super-oxydes est mal connu. Cependant, il semblerait que ce soit en interagissant avec la chaîne respiratoire. En général, le Paraquat (ou Methyl Viologen) est le composé utilisé préférentiellement pour tester un stress de type  $O_2^-$ . Nous avons testé le comportement de nos différents mutants vis-à-vis de ce dernier. Cependant, il semble que *X. campestris* soit résistant vis-à-vis de ce composé, et donc de très fortes concentrations auraient dû être utilisées. De plus, il semble que les mécanismes de défense contre ces deux composés, diffèrent légèrement, comme il a été illustré récemment dans *B. subtilis* (Cao, Moore et al. 2005). Le manganèse protège contre les  $O_2^-$  via l'enzyme SodA, mais probablement aussi de façon non enzymatique dans certaines bactéries. Nous avons donc jugé utile de vérifier le comportement de nos mutants face à un stress de type anion super-oxyde.

Dans *X. campestris*, il semble que seuls les mutants RH soient sensibles à la ménadione. Ces mutants semblent accumuler beaucoup de manganèse et peu de cuivre (cofacteur de SodC, redox-actif) et de cadmium. Nous avons remarqué que dans le cas des mutants *S. Typhimurium* M2S, la sur-expression de MntH, est nocive pour la

bactérie, en présence de ménadione. De plus, de fortes concentrations de fer ou de manganèse augmentent la sensibilité des mutants M2S. Cependant, lorsque l'on introduit les gènes *cumB-mntR-mntH*, dans les mutants *X. campestris* RH, les sensibilités au manganèse, au cadmium, et au cuivre reviennent à un niveau similaire à la souche sauvage, alors que la sensibilité à la ménadione augmente. Ceci élimine donc la possibilité que le manganèse, le cuivre ou le cadmium soient responsables du phénotype. De plus, les mutants RH ont un défaut de croissance qui n'est pas restauré, et est même augmenté, par l'introduction des gènes *cumB-mntR-mntH*. La question est donc : est-ce que le défaut de croissance est causé par une diminution des défenses contre l'anion super-oxyde, ou est ce que le défaut de croissance qui cause un artéfact de sensibilité vis-à-vis de la ménadione? Il a déjà été observé des défauts de croissance dus à un problème de défense contre les  $O_2^-$  (Tree, Kidd et al. 2005). Pour vérifier si les défauts de croissance des mutants RH et RH pCRH, sont dus à une diminution des défenses contre les  $O_2^-$ , il serait intéressant de vérifier si certaines molécules pourraient restaurer une croissance normale. On peut citer le TIRON (1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonic acid), une molécule intracellulaire qui fixe et neutralise les anions super-oxydes (Tree, Kidd et al. 2005). On pourrait tenter d'expliquer cet effet par le fait que l'expression du troisième gène potentiel dans l'opéron *mntR-mntH*, *cumB*, ait pu être affectée dans les mutants R et RH. Le gène *cumB* (*tadA*, *yfhC*), conservé chez *Xyllela* et *Xanthomonas* (hormis *S. malthophilia*), code pour une petite protéine (172 acides aminés) de la famille des Cytosine Adénosine Déaminase. Cette protéine a une similarité de 72 % (57 % d'identité) avec la protéine TadA (YfhC) de *E. coli*. Dans *E. coli* (Wolf, Gerber et al. 2002) ou *Aquifex aeolicus* (Kuratani, Ishii et al. 2005), cette protéine a été impliquée dans le changement de l'adénosine, en position 34 de l'ARN de transfert numéro 2 de l'arginine, en inosine. Ces phénomènes sont bien connus chez les mammifères (moins chez les procaryotes), comme participant aux phénomènes d'ADATs (Adenosine Deaminases Acting on tRNA). De plus, chez *Pseudomonas putida*, on retrouve ce gène en opéron avec le gène *cumA*, qui code pour une protéine de type « multicopper » oxydase impliquée dans l'oxydation du manganèse ( $Mn^{2+}$  en  $Mn^{3+}$ ). Le mutant *cumA*, *cumB*, n'est plus capable d'oxyder le manganèse, mais CumB ne semble pas impliqué dans ce phénomène. Chez *E. coli*, pour l'instant, aucun lien ne relie CumB au manganèse.

Cependant, cette protéine, associée au phénomène de cytotoxicité des protéines Gef, semble essentielle à la croissance (Wolf, Gerber et al. 2002). De même, la croissance de *P. putida* (Brouwers, de Vrind et al. 1999) ainsi que de *Bradyrhizobium japonicum* (Weidenhaupt, Schmid-Appert et al. 1995) sont affectées en l'absence de la protéine CumB. Nous avons aussi remarqué un retard de croissance des mutant RH, et il est clair que l'on pourrait incriminer CumB. Cependant, les mutants R ne sont pas affectés. Peut-être, cela est-il dû à la façon dont nous avons construit les mutants (insertion du cassette dans le gène *mntR* versus délétion du promoteur). De plus, lorsque l'on réintroduit le plasmide pCRH, qui porte aussi le gène *cumB*, le retard est amplifié. Les résultats obtenus, ainsi que la littérature très limitée concernant ce gène, ne permettent pas encore de spéculer sur le rôle possible de CumB. Cependant, le fait que ce gène ne possède pas de site de liaison à MntR dans son promoteur dans des espèces comme *E. coli* et *S. malthophilia*, ou que des espèces proches de *Xanthomonas campestris* aient un gène *cumB* qui n'appartient pas à l'opéron supposé *mntH-mntR*, implique que ce gène ne serait pas relié à l'homéostasie du manganèse, mais pourrait participer au défaut de croissance. Des expériences supplémentaires pourront être faites pour confirmer son appartenance à l'opéron *mntR-mntH* et vérifier l'expression de ce gène dans nos différents mutants, en particulier RH, R ainsi que RH pCRH. Il pourrait être intéressant d'introduire seulement les gènes *mntR-mntH* dans les mutants RH et R pour vérifier leur rôle dans nos différents phénotypes.

#### Sensibilité aux oxydants des mutants *E. coli*.

Afin de confirmer les résultats obtenus avec MntH dans les espèces *S. Typhimurium* et *X. campestris*, nous avons décidé de vérifier le comportement de certains mutants de *E. coli* disponibles dans le laboratoire, au niveau de leur sensibilité au stress oxydatif.

Nous remarquons, pour les trois souches *E. coli* testées, que la mutation *mntH*, entraîne une augmentation de la sensibilité au t-BOOH et à l' $H_2O_2$ . L'effet de la mutation *mntH* en présence de t-BOOH a été remarqué dans toutes les souches *E. coli*, *S. Typhimurium*, et *X. campestris*. De plus, comme nous l'avons vu dans la première partie,

la sur-expression d'une protéine MntH fonctionnelle (mise à part CtepB) protège les mutants *S. Typhimurium* M2S contre le t-BOOH. Dans le cas de l' $H_2O_2$ , la simple mutation de *mntH* n'est pas suffisante pour entraîner une augmentation de sensibilité chez *S. Typhimurium* (Boyer, Bergevin et al. 2002). MntH semble donc avoir un rôle plus visible en présence de t-BOOH qu'avec l' $H_2O_2$ . Nous avons, malgré tout, vu un rôle protecteur de *mntH* dans *X. campestris*, et le phénotype de sensibilité à l' $H_2O_2$  des mutants M2S peut être complémenté par la sur-expression de MntH (Boyer, Bergevin et al. 2002). D'autre part, divers travaux ont montré que le gène *mntH* est activé en présence d' $H_2O_2$  dans *S. Typhimurium* (Kehres, Janakiraman et al. 2002), dans *E. coli* (Bergevin 2003) et en présence de t-BOOH dans *E. coli* (Castillo, Cellier, non-publié). La conservation de ce phénotype dans les trois espèces suggère une conservation du rôle protecteur contre les peroxydes, de la protéine MntH. La mutation *mntH* entraîne une augmentation de sensibilité à l' $H_2O_2$ , dans les trois souches *E. coli*, lorsqu'elle est cumulée à *fur*. Ceci confirme des résultats déjà été obtenus (Bergevin 2003). Fur est, entre autres, un répresseur des transporteurs de fer. La délétion de Fur entraîne inévitablement, une augmentation de la concentration intracellulaire en Fer. Or, le Fer qui est présent dans la bactérie peut réagir avec l' $H_2O_2$ , par des réactions de type Fenton, générant ainsi des composés hautement réactifs ( $OH^{\cdot}$   $OH^{\cdot}$ ) (Bergevin 2003). De même, nous avons remarqué que l'ajout de fer dans le milieu entraîne l'augmentation des sensibilités au t-BOOH, des mutants M2S. Il n'est donc pas surprenant que la délétion de *fur* entraîne une augmentation drastique de la sensibilité t-BOOH. Le fait que les mutations *mntH* et *fur* soit cumulatives en présence d' $H_2O_2$ , suggère que MntH protège un mutant *fur*, contre l' $H_2O_2$  possiblement en transportant du manganèse (Bergevin 2003). Cependant, nous n'avons pas d'effet cumulatif visible en présence de t-BOOH, les mutants *fur* sont beaucoup plus sensibles au t-BOOH (0,5 M) qu'à l' $H_2O_2$  (9,84 M). Malgré tout, l'ajout de manganèse dans le milieu contrebalance, en partie, la mutation *fur*. L'effet du manganèse est peut être similaire à ce qui a été observé avec l' $H_2O_2$  mais les mutants *fur* sont si sensibles au t-BOOH, qu'il est nécessaire de diminuer les concentrations à un point tel que l'action de *mntH* n'est plus visible. Ces résultats, et ceux obtenus pour les mutants M2S en rajoutant du manganèse et du fer dans le milieu, ainsi que ceux obtenus avec *X. campestris* montrent que le manganèse est important, en

présence de fortes concentrations de fer (ou d'autres métaux redox actifs), pour protéger contre le t-BOOH tel qu'il a été suggéré pour l' $H_2O_2$  (Bergevin 2003).

Les mutants *S. Typhimurium* M2S ont une sensibilité accrue à la ménadione, et celle-ci est due principalement à la délétion *sitA-D*. L'étude, sur les transporteurs de manganèse MntA (homologue de SitA) et MntH, dans *S. aureus*, avait donné des résultats semblables avec le paraquat. En effet, les délétions de *mntA-mntH* entraînent une augmentation de la sensibilité, qui est exclusivement due à MntA, la délétion du gène *mntH* n'ayant pas d'effet. De plus, avec 20  $\mu$ M de manganèse dans le milieu, les phénotypes de sensibilité étaient complétés (Horsburgh, Clements et al. 2001). Nos résultats diffèrent, car nous n'avons pas pu compléter la sensibilité à la ménadione des mutants M2S avec du manganèse ni avec la sur-expression de la protéine MntH. Au contraire, nous avons obtenu une augmentation de la sensibilité. Dans le cas des mutants *E. coli* (n'ayant pas d'autres transporteurs de manganèse connus), la mutation *mntH* n'a aucun effet sur la sensibilité à la ménadione dans les trois souches testées. Nous n'avons pas observé d'effet de la mutation *mntH* ni dans *X. campestris*, ni dans *S. Typhimurium*. De même, dans *S. aureus* la mutation *mntH* n'entraîne pas non plus de phénotype visible, en présence de paraquat. De plus, la transcription du gène *mntH* ne semble pas être activée, en présence de paraquat dans *S. Typhimurium* (Kehres, Zaharik et al. 2000). Ceci suggère, que MntH n'a pas un rôle important à jouer, dans la protection contre de tels composés. Ces résultats sont surprenants car en général le manganèse a été décrit comme protégeant la bactérie contre ce type de stress (soit seul, soit comme cofacteur de Mn-Sod). Nous obtenons même un effet nocif en sur-exprimant MntH en présence de ménadione dans *S. Typhimurium*, et la mutation *mntH*, dans *E. coli*, semble même être antagoniste à celle de *sodA* (Mn-Sod).

Ces résultats amènent certaines questions : pourquoi SitABCD protège contre la ménadione dans *S. Typhimurium* et contre le paraquat dans *S. aureus* et pas MntH. Il est possible que MntH, contrairement à SitABCD, transporte un métal redox actif, qui pourrait être nocif en présence de ménadione. Une autre question qui se pose est : comment le manganèse protège-t-il contre les peroxydes *in vivo* (cofacteur, seul ou les deux phénomènes) ? Certaines enzymes protégeant contre les peroxydes ont été

caractérisées comme utilisant le manganèse comme cofacteur. Chez *S. Typhimurium*, la catalase KatN pourrait être impliquée. Cependant, cette enzyme n'est pas présente chez *E. coli* ou *X. campestris*, où le manganèse a le même effet. Il a déjà été observé *in vitro* un effet du manganèse pour détoxifier les peroxydes de façon non enzymatique. Ce même phénomène pourrait être existant *in vivo*. Ces résultats sont intéressants car certaines bactéries, contrairement aux  $\gamma$ -protéobactéries, possèdent un régulateur PerR, inactivé par les peroxydes et activé par le manganèse, qui réprime certains gènes impliqués dans la protection aux peroxydes (par exemple AhpC, Alkyl-Hydroxy-peroxydase C). Ceci peut suggérer, qu'en présence de manganèse, certains gènes protégeant contre les peroxydes sont réprimés car le manganèse est capable de protéger contre les peroxydes. Est-ce qu'un régulateur de ce type pourrait aussi exister dans les  $\gamma$ -protéobactéries ?

## **6. CONCLUSION**

Les expériences effectuées dans le cadre de ce projet de maîtrise, ont permis de démontrer que la fonction de symporteur métaux-protons est conservée pour toutes les protéines actives testées qu'elles soient de groupe A, B ou C. Toutefois, certaines différences ont pu être observées, mais l'expression dans un système hétérologue ne permet pas de tirer une conclusion définitive. Il est donc nécessaire de faire ces études dans la bactérie d'origine et de confirmer si ces différences sont bien dues à une spécificité de groupes.

Il existe de nombreuses indications que les gènes de groupe C aient pu être transférés horizontalement. Ce mode de transmission pourrait également expliquer l'origine du groupe A', comme le suggèrent de nouvelles indications, rapportées dans cette étude, d'un transfert horizontal, dans *S. marcescens*, des gènes *mntHA'*, *mntR* et plusieurs autres. Les gènes transférés horizontalement doivent représenter un avantage, pour être maintenus, notamment quand il existe déjà une copie du gène de la même famille, comme c'est le cas chez *S. marcescens*. L'absence d'activité observée pour la protéine codée par le gène *mntHA* est compatible avec l'idée que le gène hérité horizontalement (*mntHA'*) pourrait être plus important.

Durant cette étude, différentes constructions ont été réalisées qui permettront de produire des mutants stables de *S. Typhimurium sitAD* portant un allèle différent du gène *mntH*, de groupe A, A' ou C. Ainsi, il sera possible de vérifier si les groupes A' ou C peuvent représenter un avantage *in vivo*, lors de l'infection.

Dans le but d'étudier un homologue  $C\alpha$  dans son contexte endogène, nous avons construit différents mutants chez l'agent phyto-pathogène *X. campestris*, afin de vérifier *in planta* le rôle endogène de *mntHC $\alpha$*  et de *mntR*. Plusieurs phénotypes ont pu être observés et il a été montré une fonction de transporteurs de cations multiples (cadmium et cuivre). De plus, ces résultats suggèrent l'implication de MntR dans la régulation de *mntH*, et donc la fonctionnalité de l'opéron *mntR-mntH* probablement acquis par THG, mais aussi permettent de soupçonner l'existence d'acteurs encore inconnus dans l'homéostasie du manganèse.

Enfin cette étude a permis de déterminer que MntH, dont on savait déjà qu'elle était importante dans la protection contre le peroxyde d'hydrogène, joue aussi un rôle dans la protection contre un peroxyde organique et que cette fonction est conservée pour



EcolA, StypA et XcamCa. Cependant il reste à expliquer le mécanisme exact de cette protection.

L'importance du manganèse a été réévaluée récemment et il est clair qu'il n'a pas dévoilé tous ses secrets. Peut-être que les études à venir sur le rôle du manganèse nous permettront mieux de comprendre pourquoi certains groupes de protéines MntH (A'et C) peuvent être préférés à d'autres.

## **7. APPENDICE A**

**Alignement des séquences des protéines MntH de *E. coli*, *Serratia marcescens* souche db11 et souche 2170.**

**Alignement des séquences des protéines MntH de *E. coli*, *S. marcescens* db11 et 2170.**

A) Alignement, à l'aide du logiciel VectorNTI, des séquences protéiques SmarA<sub>db11</sub>, SmarA<sub>2170</sub> et EcolA. B) Alignement, à l'aide du logiciel VectorNTI, des séquences protéiques SmarA'<sub>db11</sub>, SmarA'<sub>2170</sub> et EcolA.

Les différences observées entre les protéines des deux souches de *S. marcescens* (8 pour les protéines SmarA et 1 pour SmarA') sont encadrées sur la figure.

A

*SmarA* 2170 MLNSRPVVE...  
*SmarA* db11 MLNSRPVVE...  
*EcolA* MLNSRPVVE...

*SmarA* 2170 QARI IAHATDLAEF...  
*SmarA* db11 QARI IAHATDLAEF...  
*EcolA* QARI IAHATDLAEF...

*SmarA* 2170 AAGVIGAT...  
*SmarA* db11 AAGVIGAT...  
*EcolA* AAGVIGAT...

*SmarA* 2170 LSSTVVG...  
*SmarA* db11 LSSTVVG...  
*EcolA* LSSTVVG...

*SmarA* 2170 INGYLLIGSVL...  
*SmarA* db11 INGYLLIGSVL...  
*EcolA* INGYLLIGSVL...

B

*EcolA* ...  
*SmarA* 2170 MRDAATPSSLTER...  
*SmarA* db11 MRDAATPSSLTER...

*EcolA* ...  
*SmarA* 2170 DQFSRPVV...  
*SmarA* db11 DQFSRPVV...

*EcolA* ...  
*SmarA* 2170 VTPQLPDAQAL...  
*SmarA* db11 VTPQLPDAQAL...

*EcolA* ...  
*SmarA* 2170 FGAAAAGIFLASE...  
*SmarA* db11 FGAAAAGIFLASE...

*EcolA* ...  
*SmarA* 2170 IGRWTS...  
*SmarA* db11 IGRWTS...

## **8. BIBLIOGRAPHIE**

- Abell, L. M., J. Schineller, P. J. Keck and J. J. Villafranca (1995). "Effect of metal-ligand mutations on phosphoryl transfer reactions catalyzed by *Escherichia coli* glutamine synthetase." Biochemistry **34**(51): 16695-702.
- Akman, L., A. Yamashita, H. Watanabe, K. Oshima, T. Shiba, M. Hattori and S. Aksoy (2002). "Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*." Nat Genet **32**(3): 402-7.
- Amo, T., H. Atomi and T. Imanaka (2002). "Unique presence of a manganese catalase in a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis* VA1." J Bacteriol **184**(12): 3305-12.
- Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov and S. Molin (1998). "New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria." Appl Environ Microbiol **64**(6): 2240-6.
- Andrews, N. C. (2000). "Iron homeostasis: insights from genetics and animal models." Nat Rev Genet **1**(3): 208-17.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-37.
- Archibald, F. (1986). "Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria." Crit Rev Microbiol **13**(1): 63-109.
- Banjerdkij, P., P. Vattanaviboon and S. Mongkolsuk (2005). "Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*." Appl Environ Microbiol **71**(4): 1843-9.

- 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**(5): 1135-47.
- Bell, K. S., M. Sebahia, L. Pritchard, M. T. Holden, L. J. Hyman, M. C. Holeva, N. R. Thomson, S. D. Bentley, L. J. Churcher, K. Mungall, R. Atkin, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, K. Clark, J. Doggett, A. Fraser, Z. Hance, H. Hauser, K. Jagels, S. Moule, H. Norbertczak, D. Ormond, C. Price, M. A. Quail, M. Sanders, D. Walker, S. Whitehead, G. P. Salmond, P. R. Birch, J. Parkhill and I. K. Toth (2004). "Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 11105-10.
- Bell, S. D., S. S. Cairns, R. L. Robson and S. P. Jackson (1999). "Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*." Mol Cell **4**(6): 971-82.
- Bergevin, I. Cellier M.F. (2003). "Étude de la régulation du gène *mntH* de *Escherichia coli*." Mémoire de Maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-74.
- Bonas, U. (1994). "*hrp* genes of phytopathogenic bacteria." Curr Top Microbiol Immunol **192**: 79-98.

- Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros and M. F. Cellier (2002). "Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." Infect Immun **70**(11): 6032-42.
- Bradley, D. J. (1974). "Letter: Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*." Nature **250**(464): 353-4.
- Brouwers, G. J., J. P. de Vrind, P. L. Corstjens, P. Cornelis, C. Baysse and E. W. de Vrind-de Jong (1999). "*cumA*, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1." Appl Environ Microbiol **65**(4): 1762-8.
- Bsat, N., L. Chen and J. D. Helmann (1996). "Mutation of the *Bacillus subtilis* alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) operon reveals compensatory interactions among hydrogen peroxide stress genes." J Bacteriol **178**(22): 6579-86.
- 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**(12): 4406-17.
- Cao, M., C. M. Moore and J. D. Helmann (2005). "*Bacillus subtilis* paraquat resistance is directed by SigmaM, an extracytoplasmic function sigma factor, and is conferred by YqjL and BcrC." J Bacteriol **187**(9): 2948-56.
- Carlioz, A. and D. Touati (1986). "Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?" Embo J **5**(3): 623-30.
- Cavet, J. S., W. Meng, M. A. Pennella, R. J. Appelhoff, D. P. Giedroc and N. J. Robinson (2002). "A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of



cytosol and effector binding sites to metal selectivity." J Biol Chem **277**(41): 38441-8.

Cellier, M., G. Govoni, S. Vidal, T. Kwan, N. Groulx, J. Liu, F. Sanchez, E. Skamene, E. Schurr and P. Gros (1994). "Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression." J Exp Med **180**(5): 1741-52.

Cellier, M., G. Prive, 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**(22): 10089-93.

Cellier, M. F., I. Bergevin, E. Boyer and E. Richer (2001). "Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters." Trends Genet **17**(7): 365-70.

Chaloupka, R., P. Courville, F. Veyrier, B. Knudsen, T. A. Tompkins and M. F. Cellier (2005). "Identification of functional amino acids in the Nramp family by a combination of evolutionary analysis and biophysical studies of metal and proton cotransport *in vivo*." Biochemistry **44**(2): 726-33.

Chan, J. W. and P. H. Goodwin (1999). "The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*." Biotechnol Adv **17**(6): 489-508.

Chander, M., B. Setlow and P. Setlow (1998). "The enzymatic activity of phosphoglycerate mutase from Gram-positive endospore-forming bacteria requires Mn<sup>2+</sup> and is pH sensitive." Can J Microbiol **44**(8): 759-67.

Chao, T. C., A. Becker, J. Buhrmester, A. Puhler and S. Weidner (2004). "The *Sinorhizobium meliloti fur* gene regulates, with dependence on Mn(II), transcription of the *sitABCD* operon, encoding a metal-type transporter." J Bacteriol **186**(11): 3609-20.

- Chao, Y. P., R. Patnaik, W. D. Roof, R. F. Young and J. C. Liao (1993). "Control of gluconeogenic growth by Pps and Pck in *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**(21): 6939-44.
- 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**(49): 35089-94.
- Chen, Y. W., E. E. Dekker and R. L. Somerville (1995). "Functional analysis of *E. coli* threonine dehydrogenase by means of mutant isolation and characterization." Biochim Biophys Acta **1253**(2): 208-14.
- Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson and B. N. Ames (1985). "Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*." Cell **41**(3): 753-62.
- Chung, C. T., S. L. Niemela and R. H. Miller (1989). "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2172-5.
- Compan, I. and D. Touati (1993). "Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **175**(6): 1687-96.
- Courville, P., R. Chaloupka, F. Veyrier and M. F. Cellier (2004). "Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog." J Biol Chem **279**(5): 3318-26.
- Cowan, J. A. (1997). Fundamentals of inorganic biochemistry. Ed. Wiley-VCH, New York.

- Cueto, M., O. Hernandez-Perera, R. Martin, M. L. Bentura, J. Rodrigo, S. Lamas and M. P. Golvano (1996). "Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*." FEBS Lett **398**(2-3): 159-64.
- Da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chamberg, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal and J. P. Kitajima (2002). "Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities." Nature **417**(6887): 459-63.
- Daly, M. J., E. K. Gaidamakova, V. Y. Matrosova, A. Vasilenko, M. Zhai, A. Venkateswaran, M. Hess, M. V. Omelchenko, H. M. Kostandarites, K. S. Makarova, L. P. Wackett, J. K. Fredrickson and D. Ghosal (2004). "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* Facilitates Gamma-Radiation Resistance." Science **306**(5698): 1025-1028.
- Dangl, J. L., R. A. Dietrich and M. H. Richberg (1996). "Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions." Plant Cell **8**(10): 1793-1807.
- Dashper, S. G., C. A. Butler, J. P. Lissel, R. A. Paolini, B. Hoffmann, P. D. Veith, N. M. O'Brien-Simpson, S. L. Snelgrove, J. T. Tsiros and E. C. Reynolds (2005). "A

novel *Porphyromonas gingivalis* FeoB plays a role in manganese accumulation." J Biol Chem. **280**(30):28095-102.

D'Autreaux, B., D. Touati, B. Bersch, J. M. Latour and I. Michaud-Soret (2002). "Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16619-24.

Delhaize, E., T. Kataoka, D. M. Hebb, R. G. White and P. R. Ryan (2003). "Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance." Plant Cell **15**(5): 1131-42.

Domenech, P., A. S. Pym, M. Cellier, C. E. Barry, 3rd 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**(1): 81-6.

Dow, J. M., B. R. Clarke, D. E. Milligan, J. L. Tang and M. J. Daniels (1990). "Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen." Appl Environ Microbiol **56**(10): 2994-8.

Dums, F., J. M. Dow and M. J. Daniels (1991). "Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other Gram-negative bacteria." Mol Gen Genet **229**(3): 357-64.

Durner, J., D. Wendehenne and D. F. Klessig (1998). "Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 10328-33.

Dutta, C. and A. Pan (2002). "Horizontal gene transfer and bacterial diversity." J Biosci **27**(1 Suppl 1): 27-33.

- Ernst, J. F., R. L. Bennett and L. I. Rothfield (1978). "Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **135**(3): 928-34.
- Escolar, L., J. Perez-Martin and V. de Lorenzo (1999). "Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein." J Bacteriol **181**(20): 6223-9.
- Expert, D., C. Enard and C. Masclaux (1996). "The role of iron in plant host-pathogen interactions." Trends Microbiol **4**(6): 232-7.
- Fenselau, S., I. Balbo and U. Bonas (1992). "Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals." Mol Plant Microbe Interact **5**(5): 390-6.
- Flor, H. H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." Annu Rev Phytopathol **9**: 275.
- Flyg, C., K. Kenne and H. G. Boman (1980). "Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*." J Gen Microbiol **120**(1): 173-81.
- Forbes, J. R. and P. Gros (2001). "Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions." Trends Microbiol **9**(8): 397-403.
- Franza, T., C. Sauvage and D. Expert (1999). "Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein." Mol Plant Microbe Interact **12**(2): 119-28.

- Fuangthong, M., A. F. Herbig, N. Bsat and J. D. Helmann (2002). "Regulation of the *Bacillus subtilis* *fur* and *perR* genes by PerR: not all members of the PerR regulon are peroxide inducible." J Bacteriol **184**(12): 3276-86.
- Gaballa, A. and J. D. Helmann (2002). "A peroxide-induced zinc uptake system plays an important role in protection against oxidative stress in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **45**(4): 997-1005.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman and C. I. Kado (1985). "Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria." J Bacteriol **164**(2): 918-21.
- Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire and C. Rensing (2005). "The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum." J Bacteriol **187**(5): 1604-11.
- Grosse, C., A. Anton, T. Hoffmann, S. Franke, G. Schleuder and D. H. Nies (2004). "Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*." Arch Microbiol **182**(2-3): 109-18.
- Gruenheid, S., M. Cellier, S. Vidal and P. Gros (1995). "Identification and characterization of a second mouse *nramp* gene." Genomics **25**(2): 514-25.
- 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**(4): 717-30.
- Guedon, E. and J. D. Helmann (2003). "Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators." Mol Microbiol **48**(2): 495-506.

- 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**(6641): 482-8.
- Gurlebeck, D., F. Thieme and U. Bonas (2005). "Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant." J Plant Physiol. [Epub ahead of print]
- Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson and J. Beckwith (1995). "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." J Bacteriol **177**(14): 4121-30.
- Hantke, K. (2001). "Iron and metal regulation in bacteria." Curr Opin Microbiol **4**(2): 172-7.
- Hao, Z., S. Chen and D. B. Wilson (1999). "Cloning, expression, and characterization of cadmium and manganese uptake genes from *Lactobacillus plantarum*." Appl Environ Microbiol **65**(11): 4746-52.
- Hassan, H. M. and H. C. Sun (1992). "Regulatory roles of Fnr, Fur, and Arc in expression of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(8): 3217-21.
- Hayward, A. C. (1993). "The hosts of *Xanthomonas*." Swings G, Civerolo EL, Editors. Xanthomonas. London: Chapman and Hall: 1-119.
- Helmann, J. D. (2004). "Regulation of Bacterial *mntH* Genes." The Nramp Family, Ed. Cellier et Gros, **Chapter 13**: 146-153.
- Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler and N. C. Andrews (2004). "Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism." Cell **117**(3): 285-97.

- Herbig, A. F. and J. D. Helmann (2001). "Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA." Mol Microbiol **41**(4): 849-59.
- Herman, C., S. Lecat, R. D'Ari and P. Bouloc (1995). "Regulation of the heat-shock response depends on divalent metal ions in an *hflB* mutant of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **18**(2): 247-55.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.
- Hill, P. J., A. Cockayne, P. Landers, J. A. Morrissey, C. M. Sims and P. Williams (1998). "SirR, a novel iron-dependent repressor in *Staphylococcus epidermidis*." Infect Immun **66**(9): 4123-9.
- Hopkins, S. A., F. Niedergang, I. E. Corthesy-Theulaz and J. P. Kraehenbuhl (2000). "A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells." Cell Microbiol **2**(1): 59-68.
- Horsburgh, M. J., M. O. Clements, H. Crossley, E. Ingham and S. J. Foster (2001). "PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*." Infect Immun **69**(6): 3744-54.
- Horsburgh, M. J., E. Ingham and S. J. Foster (2001). "In *Staphylococcus aureus*, *fur* is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis." J Bacteriol **183**(2): 468-75.
- Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, A. G. Cox, E. Ingham, S. Peacock and S. J. Foster (2002). "MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide



resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake." Mol Microbiol **44**(5): 1269-86.

Hosfield, D. J., Y. Guan, B. J. Haas, R. P. Cunningham and J. A. Tainer (1999). "Structure of the DNA repair enzyme endonuclease IV and its DNA complex: double-nucleotide flipping at abasic sites and three-metal-ion catalysis." Cell **98**(3): 397-408.

Huang, W. and Q. Wu (2004). "The ManR specifically binds to the promoter of a Nramp transporter gene in *Anabaena* sp. PCC 7120: a novel regulatory DNA motif in cyanobacteria." Biochem Biophys Res Commun **317**(2): 578-85.

Huang, W. and Q. Y. Wu (2004). "Identification of genes controlled by the manganese response regulator, ManR, in the cyanobacterium, *Anabaena* sp. PCC 7120." Biotechnol Lett **26**(18): 1397-401.

Igarashi, T., Y. Kono and K. Tanaka (1996). "Molecular cloning of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*." J Biol Chem **271**(47): 29521-4.

Ikeda, J. S., A. Janakiraman, D. G. Kehres, M. E. Maguire and J. M. Slauch (2005). "Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur." J Bacteriol **187**(3): 912-22.

Imbert, M. and R. Blondeau (1998). "On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium." Curr Microbiol **37**(1): 64-6.

Jabado, N., F. Canonne-Hergaux, S. Gruenheid, V. Picard and P. Gros (2002). "Iron transporter Nramp2/DMT-1 is associated with the membrane of phagosomes in macrophages and Sertoli cells." Blood **100**(7): 2617-22.

- Jabado, N., A. Jankowski, 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**(9): 1237-48.
- Jakubovics, N. S., A. W. Smith and H. F. Jenkinson (2000). "Expression of the virulence-related Sca (Mn<sup>2+</sup>) permease in *Streptococcus gordonii* is regulated by a diphtheria toxin metalloregressor-like protein ScaR." Mol Microbiol **38**(1): 140-53.
- Janssen, R., T. van der Straaten, A. van Diepen and J. T. van Dissel (2003). "Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*." Microbes Infect **5**(6): 527-34.
- Justino, M. C., J. B. Vicente, M. Teixeira and L. M. Saraiva (2005). "New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide." J Biol Chem **280**(4): 2636-43.
- Kagawa, M., N. Murakoshi, Y. Nishikawa, G. Matsumoto, Y. Kurata, T. Mizobata, Y. Kawata and J. Nagai (1999). "Purification and cloning of a thermostable manganese catalase from a thermophilic bacterium." Arch Biochem Biophys **362**(2): 346-55.
- Kammler, M., C. Schon and K. Hantke (1993). "Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*." J Bacteriol **175**(19): 6212-9.
- Karavolos, M. H., M. J. Horsburgh, E. Ingham and S. J. Foster (2003). "Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*." Microbiology **149**(Pt 10): 2749-58.

- Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Slauch and M. E. Maguire (2002). "Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup>." J Bacteriol **184**(12): 3151-8.
- Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Slauch and M. E. Maguire (2002). "SitABCD is the alkaline Mn<sup>2+</sup> transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium." J Bacteriol **184**(12): 3159-66.
- Kehres, D. G. and M. E. Maguire (2003). "Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 263-90.
- 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**(5): 1085-100.
- King, K. Y., J. A. Horenstein and M. G. Caparon (2000). "Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*." J Bacteriol **182**(19): 5290-9.
- Knodler, L. A. and B. B. Finlay (2001). "*Salmonella* and apoptosis: to live or let die?" Microbes Infect **3**(14-15): 1321-6.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd and K. M. Peterson (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-6.

- Kuratani, M., R. Ishii, Y. Bessho, R. Fukunaga, T. Sengoku, M. Shirouzu, S. Sekine and S. Yokoyama (2005). "Crystal structure of tRNA adenosine deaminase (TadA) from *Aquifex aeolicus*." J Biol Chem **280**(16): 16002-8.
- Kurz, C. L., S. Chauvet, E. Andres, M. Aurouze, I. Vallet, G. P. Michel, M. Uh, J. Celli, A. Filloux, S. De Bentzmann, I. Steinmetz, J. A. Hoffmann, B. B. Finlay, J. P. Gorvel, D. Ferrandon and J. J. Ewbank (2003). "Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening." Embo J **22**(7): 1451-60.
- Lam, E., N. Kato and M. Lawton (2001). "Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response." Nature **411**(6839): 848-53.
- Lam-Yuk-Tseung, S., G. Govoni, J. Forbes and P. Gros (2003). "Iron transport by Nramp2/DMT1: pH regulation of transport by 2 histidines in transmembrane domain 6." Blood **101**(9): 3699-707.
- Lapinskas, P. J., K. W. Cunningham, X. F. Liu, G. R. Fink and V. C. Culotta (1995). "Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase." Mol Cell Biol **15**(3): 1382-8.
- Lawrence, J. G. (1999). "Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes." Curr Opin Microbiol **2**(5): 519-23.
- Lawrence, J. G. and J. R. Roth (1996). "Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters." Genetics **143**(4): 1843-60.
- Lee, Y. A., M. Hendson, N. J. Panopoulos and M. N. Schroth (1994). "Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase." J Bacteriol **176**(1): 173-88.

- Li, H., A. K. Singh, L. M. McIntyre and L. A. Sherman (2004). "Differential gene expression in response to hydrogen peroxide and the putative PerR regulon of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." J Bacteriol **186**(11): 3331-45.
- Lieser, S. A., T. C. Davis, J. D. Helmann and S. M. Cohen (2003). "DNA-binding and oligomerization studies of the manganese(II) metalloregulatory protein MntR from *Bacillus subtilis*." Biochemistry **42**(43): 12634-42.
- Lin, J. J., M. Smith, J. Jessee and F. Bloom (1992). "DH11S: an *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors." Biotechniques **12**(5): 718-21.
- 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**(20): 6228-37.
- Low, Y. L., N. S. Jakubovics, J. C. Flatman, H. F. Jenkinson and A. W. Smith (2003). "Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*." J Med Microbiol **52**(Pt 2): 113-9.
- 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**(5): 1065-78.
- Marlovits, T. C., W. Haase, C. Herrmann, S. G. Aller and V. M. Unger (2002). "The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16243-8.

- Masse, E. and S. Gottesman (2002). "A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4620-5.
- Miesenbock, G., D. A. De Angelis and J. E. Rothman (1998). "Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins." Nature **394**(6689): 192-5.
- Milkman, R. (1997). "Recombination and population structure in *Escherichia coli*." Genetics **146**(3): 745-50.
- Miller, J. H. (1992). "A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria." Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Milton, J. S. (1992). "Statistical Methods in the Biological and Health Sciences, 2<sup>nd</sup> Edition." McGraw-Hill, Inc.
- Mino, Y., H. Wariishi, N. J. Blackburn, T. M. Loehr and M. H. Gold (1988). "Spectral characterization of manganese peroxidase, an extracellular heme enzyme from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*." J Biol Chem **263**(15): 7029-36.
- Mock, B., M. Krall, J. Blackwell, A. O'Brien, E. Schurr, P. Gros, E. Skamene and M. Potter (1990). "A genetic map of mouse chromosome 1 near the *Lsh-Ity-Bcg* disease resistance locus." Genomics **7**(1): 57-64.
- Mongkolsuk, S. and J. D. Helmann (2002). "Regulation of inducible peroxide stress responses." Mol Microbiol **45**(1): 9-15.

- Mongkolsuk, S., W. Whangsuk, P. Vattanaviboon, S. Loprasert and M. Fuangthong (2000). "A *Xanthomonas* alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*ahpC*) mutant showed an altered peroxide stress response and complex regulation of the compensatory response of peroxide detoxification enzymes." J Bacteriol **182**(23): 6845-9.
- Morgan, T. R., J. A. Shand, S. M. Clarke and J. J. Eaton-Rye (1998). "Specific requirements for cytochrome c-550 and the manganese-stabilizing protein in photoautotrophic strains of *Synechocystis* sp. PCC 6803 with mutations in the domain Gly-351 to Thr-436 of the chlorophyll-binding protein CP47." Biochemistry **37**(41): 14437-49.
- Mukhopadhyay, B., S. F. Stoddard and R. S. Wolfe (1998). "Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain deltaH." J Biol Chem **273**(9): 5155-66.
- Neidhardt, F. C., P. L. Bloch and D. F. Smith (1974). "Culture medium for enterobacteria." J Bacteriol **119**(3): 736-47.
- Odermatt, A., H. Suter, R. Krapf and M. Solioz (1993). "Primary structure of two P-type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*." J Biol Chem **268**(17): 12775-9.
- Ogawa, T., D. H. Bao, H. Katoh, M. Shibata, H. B. Pakrasi and M. Bhattacharyya-Pakrasi (2002). "A two-component signal transduction pathway regulates manganese homeostasis in *Synechocystis* 6803, a photosynthetic organism." J Biol Chem **277**(32): 28981-6.
- Ohl, M. E. and S. I. Miller (2001). "*Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis." Annu Rev Med **52**: 259-74.

- Ohtani, N., M. Haruki, M. Morikawa, R. J. Crouch, M. Itaya and S. Kanaya (1999). "Identification of the genes encoding Mn<sup>2+</sup>-dependent RNase HII and Mg<sup>2+</sup>-dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: classification of RNases H into three families." Biochemistry **38**(2): 605-18.
- Olsen, K. N., B. B. Budde, H. Siegumfeldt, K. B. Rechinger, M. Jakobsen and H. Ingmer (2002). "Non-invasive measurement of bacterial intracellular pH on a single-cell level with green fluorescent protein and fluorescence ratio imaging microscopy." Appl Environ Microbiol **68**(8): 4145-7.
- Ortiz de Orue Lucana, D., T. Schaa and H. Schrempf (2004). "The novel extracellular *Streptomyces reticuli* haem-binding protein HbpS influences the production of the catalase-peroxidase CpeB." Microbiology **150**(Pt 8): 2575-85.
- Outten, F. W., C. E. Outten, J. Hale and T. V. O'Halloran (2000). "Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*." J Biol Chem **275**(40): 31024-9.
- 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**(16): 4806-13.
- Pelletier, M., A. Forget, D. Bourassa, P. Gros and E. Skamene (1982). "Immunopathology of BCG infection in genetically resistant and susceptible mouse strains." J Immunol **129**(5): 2179-85.
- Philippe, H. and C. J. Douady (2003). "Horizontal gene transfer and phylogenetics." Curr Opin Microbiol **6**(5): 498-505.



- Plant, J. and A. A. Glynn (1976). "Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice." J Infect Dis **133**(1): 72-8.
- Posey, J. E. and F. C. Gherardini (2000). "Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen." Science **288**(5471): 1651-3.
- 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**(19): 10887-92.
- Price, M. N., K. H. Huang, A. P. Arkin and E. J. Alm (2005). "Operon formation is driven by co-regulation and not by horizontal gene transfer." Genome Res **15**(6): 809-19.
- 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**(6): 1454-68.
- Rao, N. N., S. Liu and A. Kornberg (1998). "Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response." J Bacteriol **180**(8): 2186-93.
- Rea, R. B., C. G. Gahan and C. Hill (2004). "Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence." Infect Immun **72**(2): 717-27.
- Rescigno, M., G. Rotta, B. Valzasina and P. Ricciardi-Castagnoli (2001). "Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers." Immunobiology **204**(5): 572-81.
- Richer, E. (2005). "Régulation de l'expression du gène NRAMP1 au cours de la différenciation myéloïde." Thèse INRS-Institut Armand-Frappier.

- Richer, E., P. Courville, I. Bergevin and M. F. Cellier (2003). "Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria." J Mol Evol **57**(4): 363-76.
- Richer, E., P. Courville, et al. (2004). "Molecular Evolutionary Analysis of the Nramp Family." The Nramp Family, Ed. Cellier et Gros, **Chapter 16**: 178-194.
- Robbe-Saule, V., C. Coynault, M. Ibanez-Ruiz, D. Hermant and F. Norel (2001). "Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (sigmaS)." Mol Microbiol **39**(6): 1533-45.
- Rudolph, K. (1993). "Infection of plant by *Xanthomonas*." Swings G, Civerolo EL, Editors. Xanthomonas. London: Chapman and Hall: 1-119.
- Runyen-Janecky, L. J., S. A. Reeves, E. G. Gonzales and S. M. Payne (2003). "Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition *in vitro* and in cultured cells." Infect Immun **71**(4): 1919-28.
- Sambrook, J. Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition." Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1**: 1.25-1.28.
- Schafer, A., A. Tauch, W. Jager, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Puhler (1994). "Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*." Gene **145**(1): 69-73.
- Schaible, U. E. and S. H. Kaufmann (2004). "Iron and microbial infection." Nat Rev Microbiol **2**(12): 946-53.
- Schmitt, M. P. (2002). "Analysis of a DtxR-like metalloregulatory protein, MntR, from *Corynebacterium diphtheriae* that controls expression of an ABC metal transporter by an Mn(2+)-dependent mechanism." J Bacteriol **184**(24): 6882-92.

- Schmitt, M. P. and R. K. Holmes (1991). "Iron-dependent regulation of diphtheria toxin and siderophore expression by the cloned *Corynebacterium diphtheriae* repressor gene *dtxR* in *C. diphtheriae* C7 strains." Infect Immun **59**(6): 1899-904.
- Schmitt, M. P., M. Predich, L. Doukhan, I. Smith and R. K. Holmes (1995). "Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*." Infect Immun **63**(11): 4284-9.
- Schryvers, A. B. and S. Gray-Owen (1992). "Iron acquisition in *Haemophilus influenzae*: receptors for human transferrin." J Infect Dis **165 Suppl 1**: S103-4.
- Seib, K. L., H. J. Tseng, A. G. McEwan, M. A. Apicella and M. P. Jennings (2004). "Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles." J Infect Dis **190**(1): 136-47.
- Siegele, D. A. and J. C. Hu (1997). "Gene expression from plasmids containing the *araBAD* promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 8168-72.
- Silver, S. and M. Walderhaug (1992). "Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria." Microbiol Rev **56**(1): 195-228.
- Simic, M. G., D. S. Bergtold and L. R. Karam (1989). "Generation of oxy radicals in biosystems." Mutat Res **214**(1): 3-12.

- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler. (1983). "A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria." Bio/Technology **1**: 784-791.
- Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg and M. J. Welsh (2002). "A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development." Nature **417**(6888): 552-5.
- Singh, R., B. Wiseman, T. Deemagarn, L. J. Donald, H. W. Duckworth, X. Carpena, I. Fita and P. C. Loewen (2004). "Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity." J Biol Chem **279**(41): 43098-106.
- Spatofora, G., M. Moore, S. Landgren, E. Stonehouse and S. Michalek (2001). "Expression of *Streptococcus mutans fimA* is iron-responsive and regulated by a DtxR homologue." Microbiology **147**(Pt 6): 1599-610.
- Steinmetz, M., D. Le Coq, H. B. Djemia and P. Gay (1983). "Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg." Mol Gen Genet **191**(1): 138-44.
- Stevenson, P., P. Williams and E. Griffiths (1992). "Common antigenic domains in transferrin-binding protein 2 of *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Haemophilus influenzae* type b." Infect Immun **60**(6): 2391-6.
- Stoyanov, J. V., J. L. Hobman and N. L. Brown (2001). "CueR (Ybb1) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA." Mol Microbiol **39**(2): 502-11.
- 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**(10): 5105-10.

- Supek, F., L. Supekova, H. Nelson and N. Nelson (1997). "Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function." J Exp Biol **200**(Pt 2): 321-30.
- Sutcliffe, I. C. and R. R. Russell (1995). "Lipoproteins of Gram-positive bacteria." J Bacteriol **177**(5): 1123-8.
- Suzuki, K., T. Uchiyama, M. Suzuki, N. Nikaidou, M. Regue and T. Watanabe (2001). "LysR-type transcriptional regulator ChiR is essential for production of all chitinases and a chitin-binding protein, CBP21, in *Serratia marcescens* 2170." Biosci Biotechnol Biochem **65**(2): 338-47.
- Syvanen, M. (1994). "Horizontal gene transfer: evidence and possible consequences." Annu Rev Genet **28**: 237-61.
- Tang, D. J., X. J. Li, Y. Q. He, J. X. Feng, B. Chen and J. L. Tang (2005). "The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*." Mol Plant Microbe Interact **18**(7): 652-8.
- Tanida, T., F. Rao, T. Hamada, E. Ueta and T. Osaki (2001). "Lactoferrin peptide increases the survival of *Candida albicans*-inoculated mice by upregulating neutrophil and macrophage functions, especially in combination with amphotericin B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Infect Immun **69**(6): 3883-90.
- Tao, X., J. Boyd and J. R. Murphy (1992). "Specific binding of the diphtheria *tox* regulatory element DtxR to the *tox* operator requires divalent heavy metal ions and a 9-base-pair interrupted palindromic sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5897-901.

- Tardat, B. and D. Touati (1991). "Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli* : Fur (ferric uptake regulation) and Arc (aerobic respiration control)." Mol Microbiol **5**(2): 455-65.
- 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**(9): 2305-14.
- Tree, J. J., S. P. Kidd, M. P. Jennings and A. G. McEwan (2005). "Copper sensitivity of *cueO* mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype." Biochem Biophys Res Commun **328**(4): 1205-10.
- Ueta, E., T. Tanida and T. Osaki (2001). "A novel bovine lactoferrin peptide, FKRRWQWRM, suppresses *Candida* cell growth and activates neutrophils." J Pept Res **57**(3): 240-9.
- Van den Mooter, M. and J. Swings (1990). "Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus." Int J Syst Bacteriol **40**(4): 348-69.
- van Vliet, A. H., M. L. Baillon, C. W. Penn and J. M. Ketley (1999). "*Campylobacter jejuni* contains two *fur* homologs: characterization of iron-responsive regulation of peroxide stress defense genes by the PerR repressor." J Bacteriol **181**(20): 6371-6.
- Veyrier, F. J., Castillo, E.A., Cellier, M.F. (2004). "Role of bacterial Nramp homologs during intracellular infection." 12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of FOCIS. Montréal (QC), Canada.
- Vidal, S., A. M. Belouchi, M. Cellier, B. Beatty and P. Gros (1995). "Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13." Mamm Genome **6**(4): 224-30.

- 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**(3): 655-66.
- 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**(3): 469-85.
- Wagner, D., J. Maser, I. Moric, N. Boechat, S. Vogt, B. Gicquel, B. Lai, J. M. Reyrat and L. Bermudez (2005). "Changes of the phagosomal elemental concentrations by *Mycobacterium tuberculosis* Mramp." Microbiology **151**(Pt 1): 323-32.
- Ward, P. P., S. Uribe-Luna and O. M. Conneely (2002). "Lactoferrin and host defense." Biochem Cell Biol **80**(1): 95-102.
- Watnick, P. I., T. Eto, H. Takahashi and S. B. Calderwood (1997). "Purification of *Vibrio cholerae fur* and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay." J Bacteriol **179**(1): 243-7.
- Weidenhaupt, M., M. Schmid-Appert, B. Thony, H. Hennecke and H. M. Fischer (1995). "A new *Bradyrhizobium japonicum* gene required for free-living growth and bacteroid development is conserved in other bacteria and in plants." Mol Plant Microbe Interact **8**(3): 454-64.
- Whittam, T. S., F. C. Neidhardt, R. Curtis, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and U. H. E. (1996). "Genetic variation and evolutionary processes in natural populations *E. coli*; in *E. coli* and *S. Typhimurium*: Cellular and molecular biology. 2nd Edition." American Society for Microbiology, Washington DC: 2708-2720.

- Wolf, J., A. P. Gerber and W. Keller (2002). "*tadA*, an essential tRNA-specific adenosine deaminase from *Escherichia coli*." Embo J **21**(14): 3841-51.
- Yamaguchi, K., I. Suzuki, H. Yamamoto, A. Lyukevich, I. Bodrova, D. A. Los, I. Piven, V. Zinchenko, M. Kanehisa and N. Murata (2002). "A two-component Mn<sup>2+</sup>-sensing system negatively regulates expression of the *mntCAB* operon in *Synechocystis*." Plant Cell **14**(11): 2901-13.
- Yrlid, U., M. Svensson, A. Kirby and M. J. Wick (2001). "Antigen-presenting cells and anti-*Salmonella* immunity." Microbes Infect **3**(14-15): 1239-48.
- Zaharik, M. L., V. L. Cullen, A. M. Fung, S. J. Libby, S. L. Kujat Choy, B. Coburn, D. G. Kehres, M. E. Maguire, F. C. Fang and B. B. Finlay (2004). "The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1<sup>G169</sup> murine typhoid model." Infect Immun **72**(9): 5522-5.
- 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**(4): 1974-81.
- Zou, P., I. Borovok, D. Ortiz de Orue Lucana, D. Muller and H. Schrempf (1999). "The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS." Microbiology **145** ( Pt 3): 549-59.