

Hortence Makui

**L'homologue du gène *Nramp* chez *E. coli* (*mntH*) code pour un
transporteur de cations métalliques divalents**

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

Septembre 2000

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Université du Québec

Table des matières

Table des matières	iii
Liste des figures et tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
Sommaire	ix
Introduction	1
Revue de littérature	6
1. Description générale du processus de défense de l'hôte par les macrophages	7
2. Découverte du gène <i>Nramp1</i> et immunité naturelle	7
2.1. Identification du locus <i>Bcg</i> , <i>Ity</i> , <i>Lsh</i> chez la souris	8
2.2. Le gène <i>Bcg</i> est exprimé dans les macrophages professionnels	8
2.3. Clonage du gène <i>Nramp1</i>	9
2.4. Le gène <i>NRAMP1</i> chez l'humain	9
2.5. Structure prédite de la protéine Nramp1	10
2.6. Le gène <i>Nramp1</i> et la résistance naturelle aux pathogènes intracellulaires	12
3. Site d'expression de <i>Nramp1</i>	12
3.1. Nramp1 est localisée dans les compartiments intracellulaires des macrophages	13
3.2. Nramp1 et la maturation du phagosome	13
4. Importance de Nramp2 dans le métabolisme du fer	14
4.1. Nramp2 (DCT 1) est un transporteur de cations divalents	14
4.1.1. La transferrine distribue le fer aux cellules par l'intermédiaire d'un récepteur endocyté	15
4.1.2. La souris <i>mk</i> et le rat <i>Belgrade</i> ont un défaut dans le métabolisme du fer qui est dû à une mutation du gène <i>Nramp2</i>	15
5. Rôle des homologues Nramp et mécanisme possible de Nramp1	18
5.1. Famille de protéines Nramp chez les eucaryotes	18
5.1.1. Mvl l'homologue de Nramp chez la mouche	18
5.1.2. Smf1 et Smf2, les homologues de Nramp chez la	

levure sont impliquées dans le transport du manganèse	19
5.2. Rôle biochimique proposé de la protéine Nramp1	20
5.3. Rôle des homologues Nramp dans les interactions hôtes pathogènes intracellulaires	21
6. Importance du fer et du manganèse chez <i>E. coli</i>	23
6.1. Résistance au stress oxydatif	23
6.2. Les cations métalliques (fer et manganèse) ont un rôle décisif au cours de l'infection par des bactéries pathogènes	24
6.2.1. Le fer (Fe^{2+})	24
6.2.1.1. Certains principes du fer	26
6.2.2. Le manganèse (Mn^{2+})	27
6.3. Influence du manganèse et du fer sur la croissance	28
6.3.1. Manganèse	28
6.3.2. Fer	29
7. Le fer extracellulaire est transporté à travers les membranes microbiennes via différents mécanismes	30
7.1. Les sidérophores contrôlent l'absorption du fer ferrique (Fe^{3+})	30
7.2. Synthèse de sidérophores et systèmes impliqués dans le transport du complexe (sidérophore + Fe^{3+})	31
7.2.1. Synthèse des entérobactines	31
7.2.2. Transport du complexe (entérocheline + Fe^{3+}) dans la cellule	31
7.2.3. Le métabolisme du fer intracellulaire	32
7.3. Synthèse et transport des aérobactines	33
7.4. Les protéines et les systèmes impliqués dans le transport du fer ferreux (Fe^{2+}) chez <i>E. coli</i>	34
7.5. La protéine Fur (ferric uptake régulation) est un régulateur de plusieurs systèmes de transport chez <i>E. coli</i>	35
7.5.1. Fur: répresseur des gènes de transport de fer	35
7.5.2. Les autres rôles joués par Fur	36
Discussion et Conclusion	37
Remerciements	44

Bibliographie

45

Annexe

72

Article: Identification of *Escherichia coli* K-12 Nramp ortholog (MntH)
as a selective divalent metal ion transporter

Liste des figures et tableaux

Figure 1.	Prédiction structurale et topologie trans-membranaire de la protéine Nramp1	11
Figure 2.	Modèle proposé du métabolisme de fer qui tient compte des protéines Nramp chez les mammifères	17
Figure 3.	Compétition pour des cations divalents (Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺) entre Nramp1 du macrophage et son homologue bactérien MIT au cours de l'infection	22
Figure 4 A et B.	[Fig 1A et B de l'article]: Creation of a null <i>mntH</i> allele and overexpression of the MntH protein	1067
Figure 5 A-H.	[Fig 2 A-H de l'article]: Complementation of the <i>hflB1</i> (Ts) mutant by MntH expression	1068
Figure 6 A-D.	[Fig 3 A-D de l'article]: MntH-dependant ⁵⁵ Fe ²⁺ Uptake	1069
Figure 7 A-C.	[Fig 4 A-C de l'article]: MntH-dependent Mn ²⁺ Transport	1070
Figure 8 A et B.	[Fig 5 A et B de l'article]: <i>mntH</i> belong to an ancestral gene family	1072
Tableau 1.	MntH-dependent divalent metal ions intracellular accumulation	1071

Liste des abréviations

ABC	: « ATP Binding Cassette »
ADNc	: ADN complémentaire
ARNm	: ARNmessenger
AroB	: aromatique
ATP	: adénosine 5'-triphosphate
b/b	: Belgrade
<i>Bcg</i>	: gène de résistance à <i>M. bovis</i> BCG
BCG	: bacille de Calmette et Guérin
<i>B. subtilus</i>	: bacille <i>subtilus</i>
<i>C. acetobutylicum</i>	: <i>Clostridium acetobutylicum</i>
<i>C. elegans</i>	: <i>Caenorhabditis elegans</i>
CCCP	: carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone
Cd	: cadmium
<i>CDC1</i>	: « cell division cycle 1 »
Co	: cobalt
<i>CorA</i>	: « cobalt resistance, Mg ²⁺ transporter »
CpxAR	: « conjugative plasmide expression »
Cu	: cuivre
D	: aspartate
<i>DCT1</i>	: « divalent cation transporter 1 »
DP	: 2',2' dipyridyl
<i>D. radiodurans</i>	: <i>Deinococcus radiodurans</i>
DTM	: domaine transmembranaire
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>EGTA</i>	: ethylene glycol-bis (aminoethylether)-N,N,N,'N' tétraacetic acid
<i>EntA,B,C,D,E,F</i>	: entérocheline
<i>ExbB,D</i>	: « excretion of colicin »
Fe	: fer
<i>FeoB</i>	: « ferrous iron uptake system »
<i>FepA,B,C,G</i>	: « ferric enterobactin uptake system »
<i>FhuA,B,C,D</i>	: « ferric hydroxamate uptake system »
G	: glycine
<i>Hflb1</i>	: « high frequency of bacteriophage Lambda lysogenization »
HO	: oxyde d'hydrogène
H ₂ O ₂	: peroxyde d'hydrogène
IRE	: « iron responsible element »
<i>Ity</i>	: gène de résistance à <i>Salmonella typhimurium</i>
<i>lucA,C,D</i>	: aerobactine
Ka	: constante d'affinité
kDa	: kiloDalton
Lamp1	: « lysosomal associated macrophage protein »
<i>L. donovani</i>	: <i>Leishmania donovani</i>
LPS	: lipophosphoglycan

<i>Lsh</i>	: gène de résistance à <i>Leishmania</i>
<i>M.</i>	: « <i>Mycobacterium</i> »
Mg	: magnesium
mk/mk	: anémie microcytique
Mn	: manganèse
MIT	: « metal ion transporter »
MntH	: transporteur de manganèse dépendant du proton
<i>Mvl</i>	: <i>malvolio</i>
Ni	: nickel
Nramp	: « natural resistance associated macrophage protein »
<i>NupC</i>	: nucléoside phosphatase
O ₂ ⁻	: anion superoxide
<i>Os</i>	: « <i>oryza sativa</i> »
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>PEP</i>	: « processing enhancing protein »
PrpA,B	: propionate
R	: arginine
R.E	: réticulo-endothéliaux
<i>SitABCD</i>	: « <i>salmonella</i> iron transporter »
<i>Sca</i>	: <i>Streptococcus</i> co-aggregation adhesin
<i>Smf</i>	: « suppressor of mitochondrial import fonction »
SOD	: superoxide dismutase
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
Tf	: transferrine
TfR	: récepteur de la transferrine
Tn5	: transposon 5
<i>TonB</i>	: « T-one resistance in <i>E. coli</i> »
<i>Y. pestis</i>	: <i>Yersinia pestis</i>
<i>yfeO</i>	: nomenclature systématique, gène situé sur le chromosome de <i>E. coli</i> entre 53 et 54 min d'après colibri
<i>yfeP</i>	: nomenclature systématique, gène à 54.09min sur le chromosome de <i>E. coli</i>
Zn	: zinc

Sommaire

Le gène *yfeP* de *E. coli* code pour une protéine membranaire de 412 acides aminés qui transporte les cations métalliques divalents, dénommée MntH. Le gène *mntH* appartient à une famille de gènes très conservée au cours de l'évolution et définie par les gènes *Nramp* (natural resistance associated macrophage protein). Des gènes de séquences très similaires sont retrouvés chez les procaryotes (bactéries Gram-positive et Gram-négative) et les eucaryotes (mammifères, plantes, et levures).

Chez les mammifères, Nramp1 joue un rôle primordial dans la résistance naturelle à certains pathogènes intracellulaires. Il a été suggéré que, dans les macrophages, Nramp1 permet de séquestrer le fer (Fe^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}) et d'autres cations divalents. Ces ions sont des cofacteurs d'enzymes importants pour la détoxification des radicaux oxygénés générés entre autres pendant l'explosion oxydatif.

Pour déterminer la fonction de la protéine MntH de *E. coli*, nous avons surexprimé MntH à partir du gène cloné dans le plasmide pBAD dans deux souches : chez le mutant thermosensible *hflB1* dont la croissance à 42°C dépend de certains cations divalents, et chez le double mutant *mntH / hflB1*.

Nos résultats indiquent que la surexpression de MntH module la croissance à 42°C des mutants *hflB1* en présence d'ions Fe^{2+} et Ni^{2+} et les rend hypersensibles au Mn^{2+} . À 37°C, nos expériences avec le double mutant *mntH / hflB1* montrent que MntH transporte sélectivement le Mn^{2+} , le Cd^{2+} et le Fe^{2+} , mais pourrait aussi transporter d'autres cations divalents comme le Co^{2+} , le Zn^{2+} , le Ni^{2+} , et le Cu^{2+} . D'autres expériences d'absorption de cations divalents radioactifs ont montré que MntH cotransporte sélectivement le Mn^{2+} et le Fe^{2+} en utilisant l'énergie du gradient de proton. Le nom MntH a donc été choisi pour transporteur de Mn^{2+} dépendant de protons (H).

Introduction

La survie et la virulence des bactéries pathogènes durant l'infection dépendent de leur capacité à acquérir des nutriments clés comme le fer et le manganèse. Le fer est essentiel pour le métabolisme de l'hôte et de la bactérie. Ces deux organismes ont développé des mécanismes pour obtenir cet élément de l'environnement tout en le maintenant dans un état non toxique. Une stratégie couramment utilisée par les bactéries pour acquérir et enmagasiner le fer est basée sur la production des sidérophores (Neilands, 1995), car chez les mammifères la plupart du fer est complexé aux métalloprotéines tel que la ferritine, la transferrine et la lactoferrine.

Chez les Eubactéries Gram-négatif, les systèmes impliquant les sidérophores sont induits en absence de fer, et sont composés de récepteurs membranaires de sidérophores, de protéines périplasmiques, et de plusieurs protéines associées à la membrane interne. *E. coli* peut utiliser plus de dix sidérophores différents pour acquérir le fer ferrique (Fe^{3+}) qui sont transportés via sept différents récepteurs de sidérophores dépendants de TonB. La translocation du (Fe^{3+} + sidérophore) à travers la membrane externe vers le périplasma dépend d'un complexe protéique TonB et ExbBD qui fournit l'énergie nécessaire.

E. coli et *S. typhimurium* ont de plus, la capacité d'acquérir le fer ferreux (Fe^{2+}) par un système de transport à haute affinité codé par l'opéron *feoABC* (Kammler *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996). Chez *E. coli*, le triple mutant *tonB*, *aroB*, et *feoB* est encore capable de pousser sur milieu riche (Kammler *et al.*, 1993). Il est surprenant que ce mutant qui est dépourvu d'une multitude de systèmes de transports de fer arrive malgré tout à satisfaire son besoin en fer. Ceci suggère l'existence d'autres systèmes de transports de fer encore inconnu. Ainsi par exemple, dans un milieu dépourvu de Mg^{2+} , le système de transport de cobalt CorA peut contribuer à l'approvisionnement en fer de la bactérie.

Un nombre considérable de processus métaboliques nécessite la présence Mn^{2+} chez les procaryotes et les eucaryotes (Frausto da Silva et Williams, 1991; Pecoraro, 1992). Cet élément est nécessaire comme cofacteur d'enzymes pour la synthèse des métabolites secondaires, pour la sporulation, pour la production de nombreux antigènes et toxines (Silver et Jasper, 1977), il est aussi nécessaire à l'activité d'oxydoréductase, des hydrolases et des transférases (Wedler, 1993), ainsi que pour la virulence et la pathogénèse de certaines espèces (Novak *et al.*, 1998). La caractérisation fonctionnelle

d'un transporteur de Fe^{2+} et de Mn^{2+} pourrait apporter une contribution importante à notre compréhension de la pathogénicité de certaines infections.

Chez la souris, la résistance naturelle à l'infection causée par certaines espèces de pathogènes intracellulaires comme *Salmonella*, *Leishmania*, et *Mycobacterium* est sous le contrôle génétique de l'allèle dominant *Bcg/Lsh/Ity* (Skamene *et al.*, 1982; 1984; Gros *et al.*, 1981; Goto *et al.*, 1989). Ce gène a été récemment identifié par clonage positionnel et nommé *Nramp1* pour «Natural Resistance Associated Macrophage Protein1». Une mutation ponctuelle qui remplace la glycine 169 par l'acide aspartique abroge la capacité du macrophage à résister aux infections causées par ces pathogènes non apparentés, rendant ainsi la souris sensible à ces infections. Des études ont montré que *Nramp1* modifie les propriétés du phagosome contenant des bactéries vivantes (*M. bovis*, *S. typhimurium*) incluant la maturation, l'acidification et la fusion avec les lysosomes (Govoni *et al.*, 1999; Hackam *et al.*, 1998). Ces données indiquent que *Nramp1* peut directement influencer la résistance aux infections mycobactériennes et aux salmonelloses au niveau du phagosome. L'analyse de la séquence en acide aminé déduite du gène *Nramp* montre qu'il code pour une protéine membranaire intégrale, comprenant douze domaines trans-membranaire, une boucle extracellulaire pouvant être glycosylée, de nombreux sites de phosphorylations, ainsi qu'une séquence homologue aux systèmes de transport déjà rencontrée chez les procaryotes et les eucaryotes (Vidal *et al.*, 1993).

Une seconde protéine, *Nramp2* (78% de similarité avec *Nramp1*), existe chez les mammifères et est exprimée dans de nombreux tissus (Gruenheid *et al.*, 1995). Des expériences d'électrophysiologie dans les œufs de xénope ont démontré que *Nramp2* contrôle le transport de Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} et d'autres cations divalents. Cette activité est dépendante du pH et permet le cotransport d'un ion métallique avec un proton H^+ (Gunshin *et al.*, 1997). D'autres études avec des rongeurs montrent que *Nramp2* est impliquée dans l'absorption intestinale du fer de l'alimentation et participe au cycle de la transferrine. La protéine *Nramp2* constitue de ce fait le premier transporteur de Fe^{2+} identifié chez les mammifères (Fleming *et al.*, 1997; 1998).

Nramp définit aussi une famille de protéines très conservée. Des membres ont été identifiés chez les insectes (65% d'identité), les plantes (52% d'identité), la levure (40%

d'identité) et chez plusieurs espèces de bactéries, incluant *E. coli* et *Mycobacterium* (Cellier *et al.*, 1995; 1996).

L'homologue de la protéine Smf1 de la levure est un transporteur de proton et de Mn^{2+} (Supeck *et al.*, 1996), et qui peut aussi cotransporter les protons avec le Fe^{2+} ou le Mn^{2+} (Chen *et al.*, 1999). Il a été démontré que Nramp2 pouvait fonctionnellement restaurer la croissance des mutants *smf* de levure (Pinner *et al.*, 1997) et que NRAMP1 humain peut compléter une mutation d'un gène homologue chez la drosophile (D'Souza *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la famille *Nramp* code pour une famille de transporteurs de cations divalents conservés chez les eucaryotes supérieurs.

L'hypothèse prévalente de la fonction biochimique de Nramp1 dans la résistance naturelle aux infections découle par homologie à Nramp2. Nramp1 pourrait réduire le micro environnement phagosomal, qui est normalement acide, des ions métalliques (ex : Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) cofacteurs essentiels pour les enzymes de détoxification (superoxyde dismutase et catalase). Cette action priverait les pathogènes intracellulaires de ces cofacteurs. Finalement, la découverte de gènes similaires à *Nramp* chez les bactéries a permis de penser qu'ils pourraient servir à contrer l'action de Nramp1 au niveau du phagosome.

Le séquençage génomique de *E. coli* a révélé la présence d'un gène homologue à *Nramp1*, la séquence de la protéine correspondante présente 37% d'identité avec Nramp1 dans le core hydrophobe.

Pour étudier le rôle du gène *mntH* de *E. coli*, nous avons posé comme hypothèse que son gène code pour une protéine membranaire qui transporterait sélectivement les cations divalents (Fe^{2+} , Mn^{2+}) pouvant favoriser la croissance cellulaire d'un mutant thermosensible et dépendant des cations divalents. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes fixé quatre objectifs. Le premier consistait à éliminer le gène *mntH* par échange d'allèle afin d'identifier le phénotype associé. Pour se faire nous avons utilisé un mutant dépendant de ces cations divalents. Notre deuxième objectif était de surexprimer la protéine MntH afin de déterminer si on pouvait compléter la mutation *mntH*. Le troisième objectif était d'identifier les métaux transportés par la protéine MntH.

Finalement, nous avons confirmé l'existence de *mntH* chez d'autres bactéries Gram négatives: soit un chez *Salmonella* et deux chez *P. aeruginosa*.

La réalisation de ce projet nous a permis de démontrer que la protéine Nramp de *E. coli* (MntH) transporte dans l'ordre de préférence, le Mn^{2+} , le Cd^{2+} et le Fe^{2+} suivi du Co^{2+} , et Zn^{2+} , enfin très faiblement le Ni^{2+} et le Cu^{2+} . D'autres études réalisées dans notre laboratoire en utilisant les cations radioactifs ont aussi permis de démontrer que MntH cotransporte le Mn^{2+} et le Fe^{2+} avec les protons, d'où son nouveau nom MntH : pour transporteur de Mn^{2+} dépendant des protons (H).

E. coli constitue un excellent modèle bactérien dans lequel on a pu déterminer la fonction de MntH dans le transport des métaux. De plus, cette bactérie représente un bon modèle pour les manipulations génétiques. Elle est naturellement transformable par des molécules d'ADN exogènes et facilite la recombinaison homologue qui conduit au remplacement direct des gènes dans le chromosome.

Revue de littérature

1. Description générale du processus de défense de l'hôte par les macrophages

La plupart des micro-organismes qui pénètrent dans le corps sont facilement ingérés et détruits par des macrophages présents dans tout l'organisme. Ces phagocytes opposent à l'infection une première ligne de défense innée et non spécifique à l'antigène. Les micro-organismes détruits par les phagocytes ne provoquent pas de maladies et ne nécessitent pas la mise en place d'une réponse immune adaptative. Cependant, certains pathogènes intracellulaires arrivent à croître principalement dans les vésicules des macrophages (phagosomes) où ils sont à l'abri des effets tant des anticorps que des cellules T cytotoxiques. Ces microbes se maintiennent dans l'environnement hostile du phagocyte en interférant avec le processus normal de maturation du phagosome; par exemple en inhibant la fusion des lysosomes avec le phagosome dans lequel ils croissent ou en empêchant l'acidification de cette vésicule qui est nécessaire pour l'activation des protéases lysosomales (Clemens et Horwitz, 1995; Garcia-del Portillo et Finlay, 1995). De tels micro-organismes peuvent néanmoins être éliminés lorsque le macrophage est activé par une cellule T CD4 inflammatoire.

Les mécanismes de défense de l'hôte contre les infections causées par les parasites intracellulaires ainsi que ceux qui entraînent la persistance et la réplication des parasites intracellulaires demeurent encore à élucider. Ces caractéristiques peuvent se manifester comme des déterminants génétiques tels que détectés dans la population humaine, la susceptibilité aux infections mycobactériennes (Stead, 1992) et observées dans les animaux modèles (McLeod *et al.*, 1995).

L'étude de la résistance à certains parasites intracellulaires chez la souris selon une approche de génétique inverse a permis d'identifier un facteur génétique impliqué dans l'activité bactériostatique du macrophage.

2. Découverte du gène *Nramp1* et immunité naturelle

2.1. Identification du locus *Bcg*, *Ity*, *Lsh* chez la souris

L'infection de lignées pures de souris par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin ; souche montréalaise atténuée de *Mycobacterium bovis*) est biphasique : une phase précoce non immune caractérisée par une prolifération rapide des bactéries dans les organes réticulo-endothéliaux (foie, rate) chez les souris sensibles ou par l'absence de croissance des bactéries chez les souris résistantes. Une phase tardive caractérisée soit par l'élimination des bactéries ou par la persistance de l'infection dans les organes réticulo-endothéliaux (R.E) chez les souris de souches susceptibles (Forget *et al.*, 1981)

Des analyses subséquentes de ségrégation Mendélienne montrent que la résistance au BCG est contrôlée par un gène unique, dominant et autosomal : nommé *Bcg*. Ce gène n'est pas lié au locus H-2, et son expression est détectable chez la souris durant la phase précoce d'infection (Gros *et al.*, 1981). Une autre étude localise *Bcg* sur le chromosome 1 de la souris, et montre que ce gène existe sous deux formes alléliques dans les lignées pures de souris : l'allèle dominant Bcg^f et l'allèle récessif Bcg^s (Skamene *et al.*, 1982). Des études additionnelles montrent que le gène *Bcg* régule la résistance naturelle de l'hôte à d'autres infections mycobactériennes tels que *M. leprae* et *M. smegmatis* (Brown *et al.*, 1982; Denis *et al.*, 1990).

Similaire à *Bcg*, le gène *Lsh* contrôle la réplication de *Leishmania donovani* dans les organes R.E. durant la phase précoce d'infection non immune. Dans le cas de *Salmonella typhimurium*, les souris résistantes (*Ity'*) survivent alors que celles sensibles (*Ity^s*) succombent rapidement à l'infection (Plant et Glynn, 1976). Des expériences de cartographie génétique ont indiqué que les loci *Bcg/Lsh/Ity* représentaient en fait un seul et même gène. Les gènes pour les trois caractères sont maintenant acceptés comme étant identiques (Vidal *et al.*, 1993; 1995).

2.2. Le gène *Bcg* est exprimé dans les macrophages professionnels

Le fait que *Bcg* régule la résistance à une variété de pathogènes intracellulaires non apparentés suggérait que le macrophage pourrait être le compartiment exprimant le gène. La preuve décisive du compartiment d'expression du gène *Bcg* vient des expériences faites *in vitro*, qui démontrent que les macrophages *Bcg^f* réduisent significativement la croissance de BCG, *L. donovani* et *S. typhimurium* lorsqu'on les compare aux macrophages *Bcg^s* (Stach *et al.*, 1984; Crocker *et al.*, 1987; Lissner *et al.*, 1983).

Des études *in vitro* (Olivier et Tanner, 1987) ont permis de montrer que *Bcg/Ity/Lsh* affectent la capacité du macrophage à restreindre la réplication intracellulaire des parasites intracellulaire non apparentés. Des expériences *in vivo* avec des souris mutantes, hybrides ayant la moelle osseuse irradiée suggèrent que le macrophage et le type de cellule qui exprime phénotypiquement la différence génétique de *Bcg/Ity/Lsh* (Gros *et al.*, 1983)

2.3. Clonage du gène *Nramp1*

Le locus *Bcg/Ity/Lsh* a été identifié par clonage positionnel. L'approche expérimentale est basée uniquement sur la connaissance de la position chromosomique du gène d'intérêt. Parmi les six gènes candidats identifiés dans la région chromosomique de *Bcg*, l'analyse par hybridation de type Northern a déterminé qu'un seul de ces gènes est exprimé exclusivement dans les organes R.E, et beaucoup d'ARNm de ce gène ont été retrouvés dans les macrophages dérivés de ces organes. La séquence de l'ADNc de ce gène a été déterminée. Ce gène est aujourd'hui appelé *Nramp1* «pour Natural Resistance Associated Macrophage Protein1» (Vidal *et al.*, 1993).

2.4. Le gène *NRAMP1* chez l'humain

Chez l'homme, l'homologue de *Nramp1*, *NRAMP1*, a été cloné et séquencé. Le gène a été localisé sur le chromosome 2q35 (Cellier *et al.*, 1994). La protéine NRAMP1 présente 90% d'homologie avec la protéine murine. Tout comme le gène murin qui est exprimé chez les phagocytes, le gène *NRAMP1* est fortement exprimé dans les leukocytes polymorphonucléaires et les monocytes du sang périphérique, ainsi que dans les macrophages alvéolaires des poumons (Cellier *et al.*, 1997; Govoni *et al.*, 1995).

Récemment, des études réalisées chez l'homme ont montré que les facteurs génétiques comme le polymorphisme de *NRAMP1* peuvent influencer la susceptibilité au déclenchement des maladies causées par des espèces mycobactériennes, telles la tuberculose (Bellamy *et al.*, 1998) et la lèpre (Abel *et al.*, 1998), dans certaines populations des régions où ces maladies sont endémiques.

2.5. Structure prédite de la protéine Nramp1

L'analyse de la séquence en acide aminé révèle un polypeptide hautement hydrophobe ayant entre 90 et 110 kDa et possédant certaines caractéristiques d'une protéine membranaire intégrale, comprenant douze domaines trans-membranaires (DTM), une boucle extra cellulaire extrêmement glycosylée (près de 50% de sa masse), et de nombreux sites de phosphorylation (figure 1). Sur son côté cytosolique entre les DTM 8 et 9, on note une séquence consensus (d'environ 20 acides aminés) homologue aux protéines membranaires de transport déjà rencontrées chez les membres eucaryotes et procaryotes; ce qui suggère un rôle possible dans le transport d'ions au niveau des macrophages (Vidal *et al.*, 1993).

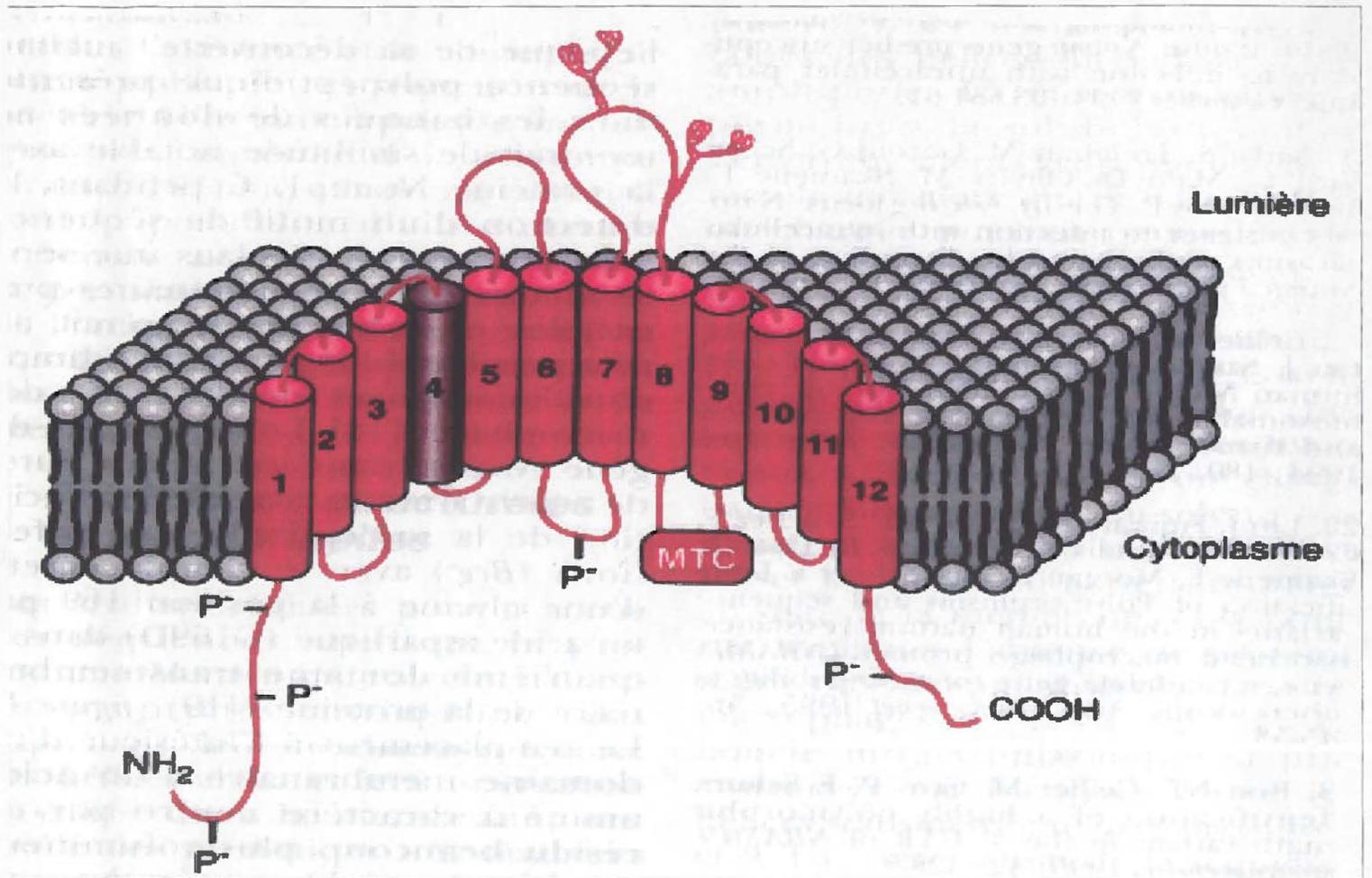


Figure 1: Prédiction structurale et de topologie transmembranaire de la protéine Nrap1
(Copiée de Cellier et Gros, 1997)

2.6. Le gène *Nramp1* et la résistance naturelle aux pathogènes intracellulaires

Plusieurs études ont permis de démontrer la capacité de *Nramp1* à réguler la phase précoce d'infection. D'autres études utilisant la lignée de macrophage murins RAW264.7 ont montré que l'expression de *Nramp1* dans les macrophages peut être régulée à la hausse en réponse au LPS bactériens et à l'interféron gamma (Govoni *et al.*, 1995). Ces expériences suggèrent que *Nramp1* influence l'activité bactériostatique et bactéricide du macrophage et par conséquent, joue un rôle clé dans les mécanismes de défenses durant la phase précoce d'infection.

Le séquençage de l'ADNc de 27 souris de race pure (20 *Bcg^s*, 7 *Bcg^r*) a révélé que la sensibilité à l'infection était associée à la substitution de la glycine par l'acide aspartique en position 169 (G169D) dans le quatrième DTM de la protéine (Malo *et al.*, 1994). De plus, cette mutation caractéristique des souris sensibles, cause une disparition complète de la protéine mature, suggérant que cette mutation affecte le processus normal d'expression de la protéine entraînant sa dégradation. Des études plus poussées ont été réalisées avec la création de lignées de souris mutantes *Nramp1^{-/-}* dépourvues du gène *Nramp1* fonctionnel. Ces souris étaient viables, d'apparence et de longévité normale, mais avaient perdu leur résistance naturelle à l'égard des espèces : *Mycobacterium*, *Salmonella* et *Leishmania* (Vidal *et al.*, 1995).

Govoni *et al.*, (1996) ont montré dans une expérience inverse qu'en transférant l'allèle résistant de *Nramp1* (*Bcg^r*) à des souris susceptibles (*Bcg^s*) on pouvait restaurer la résistance à ses mêmes pathogènes. Ainsi l'allèle *Bcg^r* confère la résistance naturelle aux infections causées par ces pathogènes.

3. Site d'expression de *Nramp1*

3.1. Nramp1 est localisée dans les compartiments intracellulaires des macrophages.

Dans les macrophages, des études biochimiques utilisant des anticorps spécifiques montrent que Nramp1 est une phosphoglycoprotéine membranaire exprimée dans les compartiments endo-membranaires. Il a été démontré par immunofluorescence en microscopie confocale que le produit du gène *Nramp1* n'est pas présent au niveau de la membrane plasmique, mais co-localise avec Lamp-1 (lysosomal associated macrophage proteine 1) dans un compartiment intracellulaire qui est positif pour des marqueurs endosomaux et lysosomaux tardifs. Nramp1 est recrutée à la membrane du phagosome avec une cinétique d'acquisition similaire à Lamp1, mais qui est clairement distincte des marqueurs endosomaux précoces (Gruenheid *et al.*, 1997). Nramp1 et Lamp1 y demeurent associées durant la maturation en phagolysosome. Ainsi, Nramp1 se trouve à proximité des pathogènes intracellulaires dont elle peut affecter la croissance. Les réseaux endosomaux et lysosomaux jouent un rôle primordial dans la destruction des cibles intracellulaires par le macrophage (Desjardins, 1995), Nramp1 pourrait contrôler la croissance intracellulaire des parasites en altérant l'environnement intra-vacuolaire du microbe contenu dans le phagosome (Gruenheid *et al.*, 1997).

3.2. Nramp1 et la maturation du phagosome

Le processus de maturation des phagosomes requiert plusieurs événements de fusions et de fissions entre le phagosome et les divers compartiments des endosomes, menant à l'acidification de la vacuole et l'acquisition d'hydrolases (Desjardins, 1995). L'acidification du pH est généralement essentiel pour l'activité microbicide du phagosome (Hackam *et al.*, 1997). Une étude examinant les propriétés du phagosome afin de mieux comprendre la survie des parasites intracellulaires dans les macrophages sauvages et *Nramp1*^{-/-} révèle que la présence de la protéine Nramp1 dans la membrane du phagosome réduit la capacité des mycobactéries à inhiber la maturation phagosomale,

incluant l'acidification et la fusion aux lysosomes (Hackam *et al.*, 1998). Les macrophages *Nramp1* sont capables d'acidifier les phagosomes contenant les mycobactéries vivantes (pH 5,5), alors que dans les macrophages *Nramp1*^{-/-}, le pH du phagosome contenant des bactéries vivantes reste élevé (pH 6,8). L'augmentation du pH dans les phagosomes des macrophages *Nramp1*^{-/-} corrèle avec la diminution de fusion de ces phagosomes aux endosomes tardifs et la diminution de l'activité vacuolaire de la H⁺ATPase.

Malgré tout, le mécanisme fondamental de ce phénomène n'est pas encore bien compris. Néanmoins, on pense que ce processus implique les ions métalliques comme le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc. Un indice de la fonction et du mécanisme de *Nramp1* émane de la découverte de la fonction de *Nramp2*.

4. Importance de *Nramp2* dans le métabolisme du fer

4.1. *Nramp2* (DCT1) est un transporteur de cations divalents

Le gène *Nramp2* des mammifères code pour une protéine très semblable à *Nramp1* (78 % de similarité). Ce gène est exprimé dans de nombreux tissus incluant le cerveau, les reins, et les cellules intestinales, ce qui le différencie de *Nramp1* qui est exprimé seulement dans les phagocytes (Gruenheid *et al.*, 1995).

La recherche de transporteur de fer intestinal selon la technique de clonage par expression a permis d'identifier la fonction de *Nramp2*. Des études d'électrophysiologie dans les œufs de xenope montrent que, *Nramp2* / DCT1 médie le transport de Fe²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ couplé au transport de protons (Gunshin *et al.*, 1997). De plus l'expression de l'ARNm de *Nramp2* est régulée à la hausse dans les cellules intestinales (duodénum) chez les souris déficientes en fer, ce qui indique que le niveau de *Nramp2* serait modulé par le fer. Une autre étude montre que l'expression de ce gène est régulée à la hausse par le manque de fer chez le rat et dans les cellules intestinales humaines (Han *et al.*, 1998). Ces

résultats suggèrent que Nramp2 est un transporteur de cations divalents, responsable de l'absorption intestinale de fer.

4.1.1. La transferrine distribue le fer aux cellules par l'intermédiaire d'un récepteur endocyté

La plupart des cellules de mammifères absorbent le fer via le cycle de la transferrine (Tf). La transferrine est une glycoprotéine sérique importante qui livre à tous les tissus le fer hépatique (principale réserve de fer de l'organisme) et le fer intestinal (site d'absorption de fer). L'apotransferrine, la forme dépourvue de fer, fixe avec forte affinité deux ions de Fe^{3+} chez les individus normaux pour former la diferritransferrine. Celle-ci à son tour se lie au récepteur spécifique de la transferrine (TfR) se trouvant à la surface des cellules. Par la suite, le complexe subit une endocytose dans les vésicules spécialisées. Ces endosomes sont acidifiés pour permettre la libération du fer et ainsi le recyclage de l'apotransferrine à la surface des cellules pour sa réutilisation (Harford *et al.*, 1994).

Les connaissances sont encore très limitées sur l'absorption et l'assimilation du fer chez les eucaryotes, entre autres : i) le mécanisme par lequel le fer traverse les endosomes membranaires pour entrer dans le cytoplasme de la cellule (probablement par un transporteur lié à la membrane qui est recruté à la surface de la cellule) ; ii) les mécanismes d'absorption trans-épithéliale au niveau de l'intestin. Il n'existe pas de TfR sur les faces apicale et basolatérale des cellules épithéliales intestinales, des cellules absorbantes et polarisées, qui contrôlent le passage du fer de l'alimentation vers le corps.

4.1.2. La souris mk et le rat Belgrade ont un défaut dans le métabolisme du fer qui est dû à une mutation du gène *Nramp2*

Les lignées de souris *mk/mk* et rat *b/b* sont pâles et ont une anémie microcytique héréditaire, autosomale et récessive. La souris avec la mutation *mk* présente des déficiences dans l'absorption du fer par les entérocytes et dans l'acquisition du fer via le cycle de la transferrine. L'administration parentérale ne permet pas de corriger cette anémie (Russell *et al.*, 1970; Bannerman *et al.*, 1972; Fleming *et al.*, 1997). Le rat Belgrade exprime un phénotype similaire à celui des souris *mk*. Il a des érythrocytes anormaux, associées à une diminution dans l'acquisition du fer au niveau des érythrocytes et des intestines (Fleming *et al.*, 1998). Des études suggèrent qu'il y a un défaut dans le mécanisme d'absorption membranaire du fer commun à plusieurs tissus. Des études utilisant les réticulocytes de rats *b/b* démontrent un défaut au niveau du transport du fer libéré de la transferrine dans les vésicules endocytiques vers le cytoplasme, ainsi qu'au niveau de la liaison et du transport du fer non lié à la transferrine de ces réticulocytes. (Fleming *et al.*, 1998).

L'équipe de Fleming a identifié par clonage positionnel une mutation conservatrice substituant la glycine par l'arginine à la position 185 (G185R) chez les souris *mk*. Cette mutation se situe dans le quatrième DTM de la séquence codante du gène *Nramp2*. Elle est considérée comme étant le défaut génétique de ces souris (Fleming *et al.*, 1997).

Récemment, la caractérisation de la mutation génétique chez le rat Belgrade a révélé une mutation qui résulte aussi de la substitution de la glycine par une arginine à la position 185 sur *Nramp2*. Cette mutation est donc identique à celle identifiée chez les souris *mk/mk*. Comme le transport du fer endosomal est aussi défectueux chez le rat Belgrade, ces observations fournissent des évidences convaincantes que *Nramp2* est probablement responsable du transport du fer endosomal et du transport du fer à travers la membrane apicale de l'entérocyte (Fleming *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces recherches identifie *Nramp2* comme le transporteur de fer de la membrane apicale des cellules épithéliales de l'intestin et le transporteur endosomal nécessaire au cycle de la transferrine (figure 2).

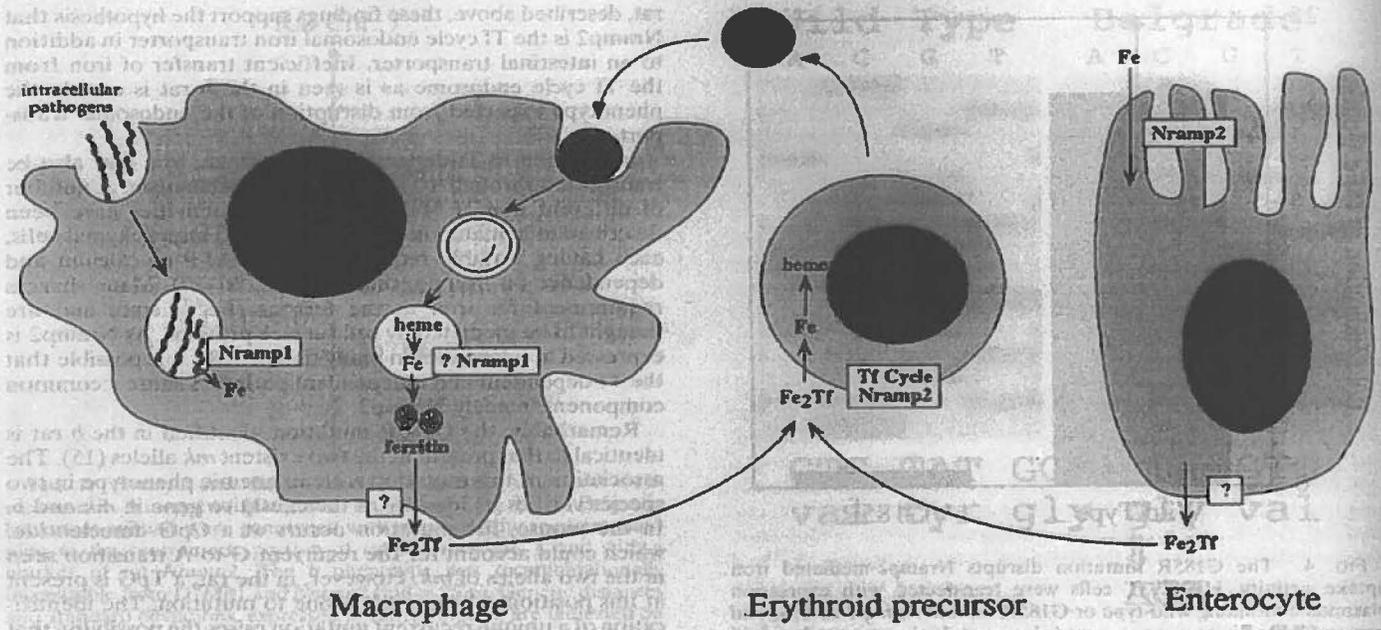


Figure 2: Modèle proposé du métabolisme de fer qui tient compte des protéines Nramp chez les mammifères
 (copié de Fleming et al., 1998)

5. Rôle des homologues Nramp et mécanisme possible de Nramp1

5.1. Famille de protéine Nramp chez les eucaryotes

Les gènes *Nramp1* et *Nramp2* codent pour une famille de protéines très conservées dans leur évolution. Le criblage des banques de données a permis d'identifier de nombreuses séquences similaires provenant d'espèces phylogénétiquement très éloignées telles que la levure, les plantes, les insectes, les nématodes et les mammifères. La plante *Oryza sativa* possède au moins trois homologues (*OsNramp1,-2,-3*) et le pourcentage d'identité est d'environ 40% avec Nramp1. Deux gènes organisés en tandem sont présents chez le nématode *C. elegans* ; les séquences polypeptidiques correspondantes montrent un pourcentage de similarité de l'ordre de 67% avec la protéine de mammifères (Cellier *et al.*, 1995; 1996).

5.1.1. Mvl l'homologue de Nramp chez la mouche

Des études récentes suggèrent que le transport des cations divalents démontré par Nramp2 est conservé chez divers membres de cette famille. Chez la drosophile, l'homologue Mvl a été identifié lors du criblage des mutants affectés dans le comportement gustatif. Mvl possède 55% d'identité avec Nramp1 des mammifères. Elle est exprimée dans le système nerveux et dans les macrophages. Des études démontrent que le gène normal *mvl* est important pour la discrimination du goût. Lors d'un test gustatif chez la mouche, celle-ci évite normalement les milieux contenant 100 mM de chlorure de sodium et préfère fortement les milieux riches en sucre, alors que les mouches ayant une mutation dans ce gène ont des réflexes contraires (Rodrigues *et al.*, 1995). Une étude récente par complémentation a démontré que le phénotype correspondant à la mutation *mvl* chez la mouche peut être corrigée par des suppléments alimentaires de Fe²⁺,

et de Mn^{2+} (Orgad *et al.*, 1998) et par *NRAMP1* (D'Souza *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la protéine Mvl serait également impliquée dans le transport des cations divalents.

5.1.2. Smf1 et Smf2, les homologues de Nramp chez la levure sont impliqués dans le transport du manganèse

La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède trois homologues (Smf1, Smf2 et Smf3) qui ont environ 30% d'identité avec Nramp1. West et ses collaborateurs pensaient que Smf1 était localisée dans la membrane mitochondriale de la levure et l'ont par conséquent nommée Smf1 pour «suppressor of mitochondrial import fonction». La surexpression de Smf1 / Smf2 a permis de compléter une mutation thermosensible dans la métalloprotéine PEP «processing enhancing protein» impliquée dans l'importation des protéines mitochondriales (West *et al.*, 1992). De même, la surexpression du gène *smf1* a permis de compléter un mutant thermosensible dans le gène *CDC1* codant pour une métalloprotéine dépendante du manganèse impliquée dans le cycle cellulaire (Supeck *et al.*, 1996). De plus, la délétion de *smf1* a entraîné une diminution de l'accumulation intracellulaire de Mn^{2+} , et sa surexpression a augmenté l'absorption intracellulaire de Mn^{2+} . La double délétion de *smf1* et *smf2* a rendu la levure hypersensible à l'EGTA et au pH basique (pH 7,9). Des études spécifiques plus récentes utilisant des anticorps ont démontré que Smf1 est localisée dans la membrane plasmique de la levure, et contrôle l'absorption de Mn^{2+} et du Zn^{2+} dans le cytoplasme (Supek *et al.*, 1996). Pinner et ses collaborateurs ont examiné si les similarités structurales assez élevées entre les protéines de mammifères (Nramp1, Nramp2) et des levures (Smf1, Smf2) résulteraient d'une complémentarité fonctionnelle chez la levure. Pour ce faire, les protéines originales et les protéines mutantes Nramp1 et 2 ont été exprimées chez les mutants de levures ayant un allèle muté dans chacun des deux gènes *smf1* et *smf2*. Nramp2, mais pas Nramp1, a restauré la croissance due à l'hypersensibilité à l'EGTA du double mutant *smf1* et *smf2* sous des conditions de stress oxydatif (Pinner *et al.*, 1997).

Une autre étude fonctionnelle démontre par l'approche électrophysiologique que l'expression de Smf1 dans les œufs de xénope facilite le cotransport de Fe^{2+} et ou de Mn^{2+} avec des protons (Chen *et al.*, 1999).

Liu et collaborateurs (1997) ont récemment démontré que Smf1, et Smf2 participent additionnellement dans le transport du Cu^{2+} et d'autres métaux lourds comme le Co^{2+} et le Cd^{2+} ce qui les rapproche du point de vue fonctionnel de Nramp2 des mammifères. Ensemble ces résultats suggèrent que la famille des gènes *Nramp* code pour une famille de transporteurs de cations divalents chez les eucaryotes.

5.2. Rôle biochimique proposé de la protéine Nramp1

Bien que Nramp1 partage 66% d'identité avec Nramp2, aucun transport de cations divalents n'a été détecté pour Nramp1, ceci malgré les efforts considérables déployés pour comprendre son rôle dans le transport des cations divalents chez la levure, les œufs de xénope ou les cellules de mammifères transformées. Mais puisque Nramp2 est un transporteur de cations divalents au même titre que l'homologue chez la drosophile et la levure, on a émis l'hypothèse que Nramp1 serait probablement impliquée dans le transport de cations divalents.

L'hypothèse généralement acceptée est que la protéine Nramp1 appauvrirait le microenvironnement phagosomal des ions essentiels tels que le fer (Fe^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}), et possiblement d'autres cations comme le zinc (Zn^{2+}) nécessaires pour la survie et la réplication des pathogènes (Crosa *et al.*, 1997). Nramp1 servirait à l'hôte pour appauvrir le phagosome et à enrichir son cytoplasme et, par conséquent, priverait l'homologue bactérien de ces ions nécessaires pour de nombreuses enzymes. Les bactéries deviendraient alors des proies faciles pour les macrophages. Inversement, une augmentation de la concentration des ions métalliques dans le phagosome due par exemple à un défaut du transporteur Nramp1 (*Bcg*^s) devrait permettre la croissance des mycobactéries et rendre l'organisme plus sensible aux pathogènes.

5.3. Rôle des homologues Nramp dans les interactions hôtes pathogènes intracellulaires

Les ions métalliques comme le Fe^{2+} et le Mn^{2+} sont importants, notamment pour la croissance microbienne et la résistance au stress oxydatif. Il a été suggéré que le macrophage et la bactérie intracellulaire pourraient compétitionner pour les mêmes substrats durant l'infection. La découverte des séquences similaires à *Nramp* chez plusieurs bactéries suggèrent que les protéines des pathogènes intracellulaires pourraient compétitionner avec Nramp1 pour les métaux limitants à l'intérieur du phagosome (figure 3). Cette hypothèse requiert la démonstration que les protéines microbiennes similaires à Nramp agissent comme transporteur de cations métalliques.

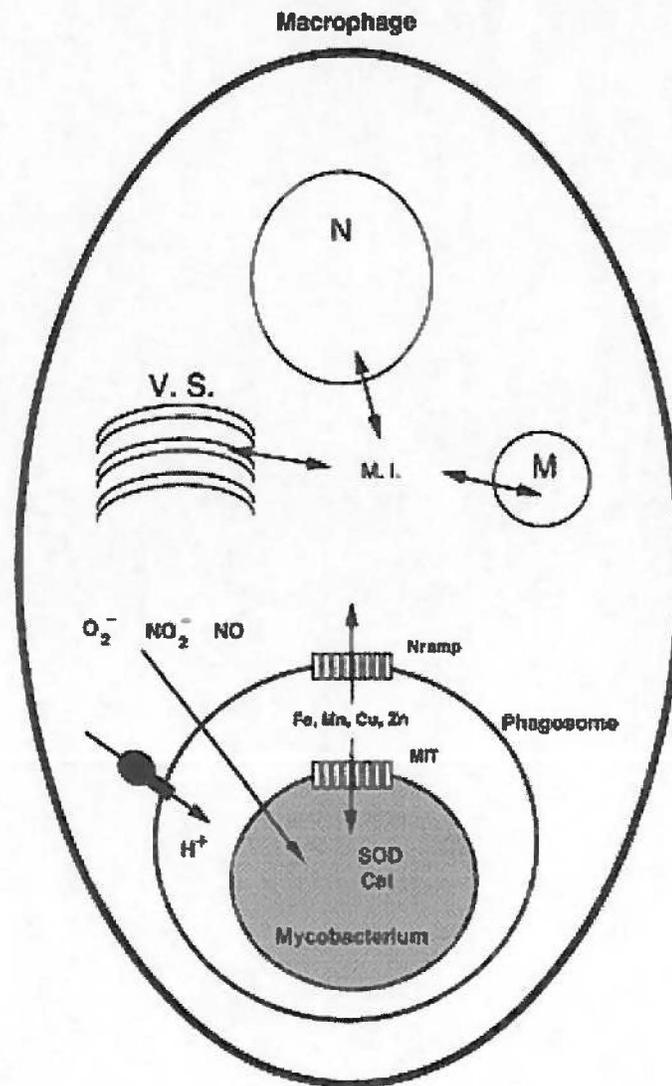


Figure 3 : Compétition pour des cations divalents (Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) entre Nramp1 du macrophage et son homologue bactérien MIT au cours de l'infection.

(Adapté de Nelson., 1999)

6. Importance du fer et du manganèse chez *E. coli*

6.1. Résistance au stress oxydatif

Le stress oxydatif est causé par une exposition à des radicaux oxygénés tel que l'anion superoxide (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles ($HO\cdot$) combinés ou non aux radicaux d'oxyde nitrique. Ces radicaux sont des produits normaux du métabolisme cellulaire et peuvent en cas d'accumulation endommager les protéines, les acides nucléiques et les membranes cellulaires (Arouma et Halliwell, 1998). Pour contrer l'effet de ces oxydants, les cellules expriment constitutivement des enzymes qui les détoxifient et réparent les dommages infligés. Les cations (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) sont importants pour les monocytes, les neutrophiles, et les macrophages car ils sont impliqués dans la génération des radicaux intermédiaires oxygénés durant l'explosion respiratoire. Ces radicaux oxygénés libérés par les phagocytes peuvent entre autre bloquer le processus respiratoire de la bactérie, oxyder directement l'ADN (Hori *et al.*, 1996; Beckman *et al.*, 1990). Pour se protéger, les bactéries expriment également la SOD qui convertit les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène qui sont décomposé par la catalase (McCord et Fridovich, 1969).

Les SOD sont classées en fonction de leur cofacteur au niveau du site actif et ont aussi des localisations différentes. Au début, on pensait que la [Cu/Zn]-SOD était exprimée ubiquitairement dans le cytoplasme des eucaryotes, mais récemment, il a été démontré que cette métalloenzyme était aussi présente au niveau du périplasme de certaines bactéries pathogènes Gram négative (Steinman et Ely, 1990; Benov *et al.*, 1995; Kroll *et al.*, 1991), entre autre chez *E. coli* (Benov et Fridovich, 1994). Récemment, on a démontré la présence de deux gènes différents chez *Salmonella* (Canvin *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1999).

Il existe deux autres protéines SOD chez *E. coli* (Fe-SOD et Mn-SOD). Fe-SOD est codé par le gène *sod B*, et son activité est pratiquement similaire sous toutes les conditions de croissance. Mn-SOD est codé par le gène *sodA*, son activité est grandement

modulée par la menace oxydative de l'environnement (Hassan et Fridovich, 1978; Moody et Hassan, 1984; Privalle et Fridovich., 1990), et sa régulation est dépendante du métal au niveau transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Beyer et Fridovich, 1991; Privalle et Fridovich, 1992). Ces deux enzymes sont localisées dans le cytoplasme des bactéries. Leur fonction suscite des controverses, certains pensent que leur rôle consiste à débarrasser la bactérie des radicaux oxygénés se trouvant à l'extérieur et à l'intérieur de la bactérie; et d'autres suggèrent qu'elles débarrasseraient seulement le cytoplasme des anions superoxydes générés durant le métabolisme aérobie. La [Cu/Zn]-SOD de *E. coli* permet de protéger le périplasma ou les constituants de la membrane des superoxydes générés à l'extérieur de la cellule ou qui se retrouve à ce niveau. La localisation périplasmique de cette dernière lui donne le potentiel de jouer un rôle dans la pathogenèse des infections par *Salmonella*, les protégeant des effets bactéricides des radicaux libres générés après interaction avec le phagocyte (Farrant *et al.*, 1997). D'autres études supportent l'hypothèse que cette enzyme, par sa capacité de réduire les dommages oxydatifs induits par l'explosion respiratoire, représenterait un important facteur de virulence dans la pathogenèse bactérienne (Battistoni *et al.*, 1998).

6.2. Les cations métalliques (le fer et le manganèse) ont un rôle décisif au cours de l'infection par des pathogènes.

6.2.1. Le fer

Le fer est un élément essentiel pour de nombreux processus métabolique basés sur le transport d'électrons. Cependant, il présente le danger de générer un stress oxydatif par des réactions non contrôlée avec l'oxygène, et doit être séquestré pour limiter sa toxicité. Le fer est très peu soluble dans les fluides biologiques à pH neutre (Wooldridge et Williams 1993; Guerinot, 1994). Chez les mammifères, le fer est en grande partie

complexé avec les métalloprotéines ou séquestré par les protéines spécialisées (Mietzner et Morse, 1994).

Les pathogènes qui établissent une infection chez leur hôte sont souvent obligés d'intercepter le fer des protéines de réserve de l'hôte, pour le diriger à leur avantage. La disponibilité en fer influence les interactions hôte-parasite: si la balance du fer est en faveur de l'hôte, le microbe peut être éliminé, dans le cas contraire le pathogène peut envahir son hôte (Weinberg, 1995). Suite à l'infection, l'hôte réduit sa concentration sérique en fer d'environ 30% de son niveau normal, rendant ainsi difficile son acquisition par les microbes (Weinberg, 1984). Dans le macrophage, le fer est soit lié à la transferrine, complexé dans la ferritine soit enmagasiné dans les protéines possédant un groupe hème (Bridges, 1990; Crichton et Charloreaux-Wauters, 1987; Muller-Eberhard et Nikkila, 1989). Son absence à l'état libre dans l'animal constitue un signal majeur pour déclencher l'expression des déterminants de virulence (Litwin et Calderwood, 1993). Il a été clairement démontré chez le mutant spontané non pigmenté de *Y. pestis* (*Pgm-*) qu'il existe une relation entre la disponibilité en fer et la virulence chez la souris. La virulence du mutant *Pgm-* a été restaurée par inoculation péritonéale avec des suppléments de fer inorganique (Jackson et Burrows, 1956).

Des études démontrent que les systèmes de transport à forte affinité pour le fer chez les bactéries (sidérophores, les récepteurs de surface qui lient la transferrine, la lactoferrine et les protéines contenant un groupement hème) constituent des facteurs de virulence importants des bactéries qui infectent les fluides et les tissus des animaux, car ils peuvent chélater les métaux liés aux protéines de l'hôte (Franza *et al.*, 1999; Litwin et Calderwood, 1993).

Par ailleurs, les bactéries pathogènes possèdent fréquemment plusieurs systèmes d'absorption de fer. Les récepteurs pour le transport de la transferrine de la lactoferrine et des protéines hémiqes sont exprimés chez *Neisseriae* pathogènes (Genco et Desai, 1996; Gray-Owen et Schryvers, 1996; Pettersson *et al.*, 1997). *Shigella flexneri* utilise les sidérophores et les composants de l'hème pour obtenir le fer, mais il est aussi capable de lier la lactoferrine (Tigyi *et al.*, 1992; Payne, 1988). Des stratégies similaires sont aussi observées chez *Vibrio cholerae* et chez *haemophilus influenzae*.

La présence de multiples mécanismes pour obtenir le fer chez ces bactéries et autres bactéries pathogènes met en évidence l'importance de l'acquisition du fer dans la virulence de ces micro-organismes.

6.2.1.1. Certains principes du fer

Le fer est un des métaux les plus abondants sur la terre. L'utilisation efficace du fer comme biocatalyseur nécessite une conformation stricte avec les contraintes dictées par la solubilité et les propriétés réactives du fer. Ne pas tenir compte de ces principes entraînerait tôt ou tard un désastre dans la biologie de la cellule. Quatre principes majeurs régissent l'utilisation de cet ion :

La tendance du Fe^{3+} à précipiter de la solution signifie qu'en aérobiose les cellules devraient posséder des systèmes d'acquisition pour solubiliser, transporter et assimiler le fer (Cornelissen et Sparling, 1994).

L'absorption du fer doit être régulée et corrélée selon le besoin, l'optimum de la quantité de fer par cellule ne doit pas être dépassé. Le fer catalyse la production des radicaux libres signifiant que la présence intracellulaire du fer libre ne pourrait pas être tolérée, car potentiellement toxique pour la cellule. En conséquence, la cellule doit garder la quantité de fer intracellulaire en transit à un niveau très bas. Par contre une quantité insuffisante peut entraîner un retard de la croissance, puisque le fer est cofacteur de nombreux enzymes. Des études montrent que la sensibilité au H_2O_2 de *M. smegmatis* augmente quand son milieu de culture est pauvre en fer (Lundrigan *et al.*, 1997).

Les cellules doivent avoir un moyen pour détoxifier l'excès de fer. La défense contre les effets toxiques du fer est en partie accomplie, par son stockage dans la ferritine sous la forme Fe^{3+} ; dans cet état, le fer est incapable de catalyser la production des radicaux oxygénés sauf s'il quitte cette coquille. Il a été suggéré que le rôle majeur de la ferritine est de détoxifier le fer de la bactérie (Harrisson et Arosio, 1996).

Enfin des systèmes de défense antioxydants sont nécessaires pour empêcher la réaction des radicaux libres avec le fer intracellulaire. Une fonction importante des

enzymes intracellulaires de défense antioxydantes est la destruction des radicaux O_2^- et H_2O_2 avant même qu'ils n'entrent en contact avec le fer. Le fer et l'hème sont des cofacteurs nécessaires pour détoxifier l'anion superoxyde, pour cliver le H_2O_2 , et pour détoxifier une variété de peroxydes (Fridovich, 1978).

6.2.2. Le manganèse (Mn^{2+})

Les bactéries utilisent cet élément trace comme groupement prosthétique pour de nombreux enzymes. Cet élément est nécessaire pour la synthèse des métabolites secondaires, pour la sporulation et pour la production de nombreux antigènes et toxines (Silver et Jasper, 1977), mais seulement un petit nombre d'enzymes qui nécessitent le Mn^{2+} pour leur activité a été caractérisés. Ceci inclus les enzymes redox comme la Mn-SOD, les enzymes métaboliques comme la pyruvate carboxylase et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Frausto da Silva et Williams, 1991; Pecoraro, 1992). Deux espèces, *Lactobacillus* et *Treponema* sont connues pour utiliser le Mn^{2+} en lieu et place du fer (Posey *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 1999).

La caractérisation de l'opéron *sca* de *Streptococcus gordonii* qui fait partie de la superfamille des transporteurs de type ABC a fourni l'évidence que cet opéron code pour un transporteur de Mn^{2+} à haute affinité. Cette perméase apparaît nécessaire pour la croissance dans un environnement limité en Mn^{2+} et elle fournit un mécanisme vital pour l'acquisition de Mn^{2+} et la survie dans l'hôte humain (Kolenbrander *et al.*, 1998). Un système homologue a été identifié chez plusieurs espèces de pathogènes.

Posey *et al.*, (1999) ont démontré que le facteur de transcription TroR de *T. pallidum* est activé spécifiquement par le Mn^{2+} et aussi, cette protéine joue un rôle pivot dans la pathogenèse syphilitique. Par ailleurs, le locus *psa* de *Streptococcus pneumoniae* qui code pour une perméase de type ABC est impliquée dans la tolérance à la pénicilline (Novak *et al.*, 1998) ce qui permet la survie du *Streptocoque* en présence de cet antibiotique. Chez les bactéries à Gram négatif, le système Yfe ABCD de *Yersinia pestis*

code pour un transporteur ABC qui transporte le Fe^{2+} et le Mn^{2+} et son expression est régulée par le fer et le facteur transcriptionnel Fur. L'opéron *yfe* est réprimé en présence du Mn^{2+} et est nécessaire pour la virulence de *Yersinia*. Pareillement le système *Sit ABCD* de *Salmonella Typhimurium* code pour un transporteur qui est nécessaire pour sa virulence complète (Janakiraman et Slauch, 2000) et fait partie d'un îlot de pathogénicité (Zhou *et al.*, 1999).

Une diminution dans la disponibilité des ions Fe^{2+} et Mn^{2+} aura un effet néfaste pour une bactérie pathogène pour ce qui est de sa croissance et sa résistance au stress oxydatif.

6.3. Influence du manganèse et du fer sur la croissance bactérienne

6.3.1. Manganèse

En plus de son rôle dans la virulence, l'ion manganèse est essentiel pour la croissance et la division chez certaines bactéries telles que *Lactobacillus* et *Treponema*. Des besoins en manganèse ont été observés chez plusieurs bactéries Gram-négatif et Gram-positif. Par exemple, Darke *et al.*, (1988) ont montré que l'expression de la lectine liant les glucanes chez des groupes de mutants *Streptococci* dépendait de la présence du Mn^{2+} dans le milieu de croissance.

Il existe un nombre considérable de processus métaboliques impliquant des enzymes qui régissent Mn^{2+} comme cofacteur: il est cofacteur des oxydoréductases, des transférases, des kinases, des hydrolases, des isomérases, des ligases, des lectines et des intégrines chez les procaryotes et les eucaryotes. (Frausto da Silva et Williams, 1991; Pecoraro, 1992). Deux types de transporteurs de Mn^{2+} de haute affinité ont été jusqu'à maintenant décrits. Le premier système de transport de Mn^{2+} à haute affinité à être bien documenté incluant les paramètres cinétiques et la spécificité du substrat sont celui de la souche PCC 6803 de la Cyanobactérie *Synechocystis*. Ce système est un membre de la

superfamille des transporteurs ABC présent chez les microbes et les humains (Saier, 1998; Tomii et Kanehisa, 1998). Les gènes responsables de ce transport sont organisés en un opéron *mntCAB* qui code pour trois gènes très liés (Bartsevick et Pakrasi, 1995). Des homologues de ce type de transporteur ont été aussi identifiés chez *Streptococcus pneumoniae* et *S. gordonii* (Dintilhac *et al.*, 1997; Kolenbrander *et al.*, 1998). Une autre classe de transporteur de Mn^{2+} est représentée par la protéine MntA de *L. plantarum* qui appartient à la superfamille des P-type ATPase (Hao *et al.*, 1999). Il n'y a pas d'homologue de ces systèmes dans le génome de *E. coli*, de plus, aucun système spécifique de transport de Mn^{2+} n'a été décrit à ce jour chez cette bactérie.

6.3.2. Le fer

L'importance du fer dans les systèmes biologiques est largement due à ses deux valences stables (Fe^{3+} , Fe^{2+}), qui lui permettent de catalyser plusieurs réactions chimiques essentielles dans la cellule: il est entre autre impliqué dans la biosynthèse des nucléotides et dans la production d'énergie. À l'exception des membres du genre *Lactobacillus* et *Treponema* qui ont remplacé le fer par le Mn^{2+} , toutes les autres bactéries ont besoin du fer pour leurs processus métaboliques. La concentration de fer permettant la croissance optimale de *E. coli* est environ de 0,3-1,8 μM , alors que dans le sol la concentration de fer est 0,1 μM et seulement de $10^{-9} \mu M$ dans les mammifères. La concentration utilisée dans la plupart des laboratoires est de 10-100 μM . Par ailleurs, le fer en milieu aérobie et à pH neutre est très souvent sous forme oxydée Fe^{3+} . Sous cette forme, il est extrêmement insoluble ($10^{-18} \mu M$) ce qui le rend encore plus rare (Braun et Killmann, 1999). Pour contrecarrer ce manque de fer, les microbes ont développé des mécanismes remarquables et sophistiqués pour aller chercher le fer disponible pour leurs besoin. Les microbes peuvent obtenir le fer en utilisant directement les protéines liant le fer chez l'humain (Cornelissen et Sparling, 1994), ou encore par la production des composés létaux (exotoxines) qui éliminent alors la compétition pour la source de fer disponible (Bjorn *et*

al., 1978; Calderwood et Mekalanos, 1987). Une autre stratégie utilisée par les bactéries consiste à sécréter et excréter de petits composés appelés sidérophores (Neilands, 1981).

7. Le fer extracellulaire est transporté à travers les membranes microbiennes via différents mécanismes

7.1. Les sidérophores contrôlent l'absorption du fer ferrique (Fe^{3+})

Les sidérophores sont de puissants chélateurs de fer de masse moléculaire comprise entre 500 et 1000 Da (Neilands, 1981; 1995). Ces molécules ont une forte affinité pour le fer ferrique ($K_a 10^{30}$), elles peuvent lier le fer même quand la disponibilité est aussi réduite que 10^{-19} M. De plus, les sidérophores peuvent solubiliser le fer d'un complexe insoluble puis le protéger contre la participation à la formation des radicaux oxygénés.

Il existe une variation considérable au niveau de la structure des sidérophores, cependant, on les regroupe sous deux classes majeurs: les hydroxamates et les cathécolates (Neilands, 1995). *E. coli* synthétise les deux classes: les catécholates (entérobactines) et les hydroxamates (aérobactines). Ce dernier groupe est nécessaire pour la virulence chez les animaux (Crosa, 1989; Warner *et al.*, 1981; Williams, 1979). Les sidérophores sont généralement synthétisés et excrétés hors de la cellule pour aller complexer le fer puis sont retransportés à l'intérieur de la cellule par des systèmes protéiques spécifiques adaptés. La taille du complexe (sidérophore + Fe^{3+}) excède celle de la limite d'exclusion des porines (600 Da) (Nikaido, 1996), par conséquent, leur absorption nécessite des systèmes de transport spécialisés. L'expression des gènes codant pour la synthèse des sidérophores et leurs systèmes de transports est déclenchée par une diminution du fer intracellulaire.

7.2. Synthèse de sidérophores et systèmes impliqués dans le transport du complexe (sidérophore + Fe³⁺)

7.2.1 Synthèse des entérobactines

Les entérobactins (synonyme: entérochelin) sont synthétisés et transportés à travers les membranes externes et internes, par un groupe de 13 gènes *ent-fep*. La formation des entérochelins commence par la synthèse de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque à partir de l'acide chorismic et des produits de gènes *entC*, *entB*, et *entA* suivie par les produits de quatre autres gènes: *entD*, *entE*, *entF* et *entA* qui permettent de compléter sa formation (Crosa, 1989; Silver, 1978; Neilands, 1990). Après sa synthèse, l'entérochelin doit être rapidement exportée hors de la cellule par un mécanisme qui demeure encore inconnu, ceci dans le but de protéger la chélation du fer intracellulaire disponible. La caractérisation de la protéine EntD montre qu'elle est associée à la membrane interne, il a été suggéré que cette protéine serait impliquée directement dans l'exportation extracellulaire des entérochelins (Armstrong *et al.*, 1989), ce qui protégerait la cellule des effets toxiques d'un excès d'entérochelins intracellulaire.

7.2.2. Transport du complexe (entérocheline + Fe³⁺) dans la cellule

Une fois à l'extérieur de la cellule l'entérocheline se lie au Fe³⁺ et le complexe est sélectivement transporté à travers la membrane externe de la bactérie par un récepteur spécifique (FepA). L'activité de FepA réside dans un petit segment externe hydrophobe entre les acides aminés 290 et 339. Une séquence spécifique de l'extrémité N-terminale de la protéine FepA, appelée boîte TonB, constitue le site d'interaction avec la protéine TonB (Nau et Konisky, 1989).

TonB est une protéine périplasmique ancrée dans la membrane cytoplasmique par son extrémité N-terminale hydrophobe (Postle et Skare, 1988; Skare *et al.*, 1989; Roof *et al.*, 1991). La protéine TonB est liée à deux protéines accessoires, ExbB et ExbD. Ce complexe de protéines utilise le potentiel électrochimique de la membrane cytoplasmique (Bradbeer, 1993; Hannavy *et al.*, 1990) pour changer la conformation du récepteur, qui à son tour permet la translocation du complexe (Fe^{3+} + sidérophore) à travers la membrane externe. Ce changement de conformation permet une interaction physique entre la région C-terminal de TonB et le récepteur (Skare *et al.*, 1993). Une fois que le ligand (Fe^{3+} + sidérophore) pénètre dans l'espace périplasmique, il est libéré de son récepteur et se lie à la protéine périplasmique (FepB), qui délivre le ligand aux perméases localisées dans la membrane cytoplasmique (FepG et FepD). Le passage du ligand à travers la membrane interne nécessite FepC, cette dernière est une protéine associée à la membrane interne qui fournit au complexe l'énergie à partir de l'hydrolyse de l'ATP.

7.2.3. Le métabolisme du fer intracellulaire

Dans le cytoplasme, la suite du mécanisme est controversée ; certains chercheurs pensent que, comme les sidérophores ont une faible affinité pour le Fe^{2+} comparé à celle de Fe^{3+} , on assume que la réduction est essentielle pour la libération du fer de son sidérophore, et nécessiterait des réductases (Fontecave *et al.*, 1994). Il existe des évidences montrant que le Fe^{3+} absorbé avec l'aide des sidérophores est réduit en Fe^{2+} (Matzanke *et al.*, 1991). D'autres pensent que dans le cytoplasme, une autre enzyme nommée Fes (entérochelin estérase) clive l'entérochelin et permet la libération et la réduction subséquente du fer Fe^{3+} en Fe^{2+} ce qui le rend disponible pour le métabolisme intracellulaire (Brickman et McIntosh, 1992). Plusieurs choses restent encore incomprises; entre autres, le devenir de ce fer intracellulaire: est-ce qu'il est immédiatement incorporé dans les enzymes ou stocké sous forme de Fe^{3+} dans les protéines de réserve (bactérioferritine et ferritine). Aussi, il reste encore à déterminer si le

sidérophore est recyclé après la libération de son fer, ou détruit par des hydrolases cellulaires et comment sont exportés les sidérophores nouvellement synthétisés.

7.3. Synthèse et transport des aérobactines

La biosynthèse des aérobactines est plus simple que celle des entérobactins. Les gènes codant pour ces sidérophores sont généralement portés par un plasmide de virulence. Elle commence par l'hydroxylation du groupe amino de la lysine avec l'oxygène moléculaire sous l'action du polypeptide IucD, suivi de l'ajout d'un groupe - amino par l'effet de la protéine IucB, puis d'une autre protéine IucA et enfin par IucC complète la synthèse de l'aérobactin (Bagg et Neilands, 1987).

Le mécanisme de transport du complexe (aérobactine + Fe^{3+}) se fait sur le même principe que celui du complexe (entérobactine + Fe^{3+}). Tout comme pour les catécholates le transport des complexes (hydroxamates + Fe^{3+}) implique aussi le produit de plusieurs gènes: *fhuA*, *fhuB*, *fhuC* et *fhuD*.

Dans le cas du transport des hydroxamates, le récepteur de la membrane externe FhuA est multifonctionnel. Il sert comme transporteur du fer complexé au ferrichrome, celui-ci appartient à une classe de sidérophores qui solubilise Fe^{3+} , il sert aussi de molécules de surface pour l'antibiotique albomycine, pour la toxine protéique (colicine), FhuA fonctionne aussi comme récepteur pour plusieurs virus (phages.T1,T5,Ø80 et UC-1) qui se multiplient chez *E. coli* (Ferguson *et al.*, 1998). L'activité de ce récepteur reste dépendante de l'énergie fournie par la force proton motrice de la membrane cytoplasmique car il n'existe pas de source d'énergie à la membrane externe.

L'énergie est transmise de la membrane cytoplasmique à la membrane externe par le complexe de protéines TonB, ExbB, et ExbD. Les deux premières sont localisées dans le périplasme (Braun, 1995). Il a été génétiquement et biochimiquement démontré que TonB interagit avec FhuA. Les protéines ExbB et ExbD sont nécessaires pour le transport dépendant de TonB et la protéine ExbB pourrait être la clé du mécanisme d'utilisation du

potentiel électrochimique de la membrane cytoplasmique par le complexe de protéines qu'elles forment.

Comme tous les ligands liés aux récepteurs TonB-dépendant (Braun et Herrmann, 1993; Bassford *et al.*, 1976) à l'exception du phage T5, (Bonhivers *et al.*, 1996), tous les ligands de FhuA subissent aussi un changement de conformation après avoir reçu l'énergie transmise par le complexe protéique TonB, ExbB et ExbD, ce qui permet la translocation du complexe (Fe^{3+} + hydroxamate) à travers la membrane externe (Hantke et Braun, 1978; Postle, 1993; Larsen *et al.*, 1996; Stojiljkovic et Srinivasan, 1997). L'interaction physique de TonB avec le récepteur de la membrane externe (FhuA) a été démontrée par des mutations effectuées près de l'extrémité N-terminal des récepteurs, qui est la boîte TonB. Cette interaction est supprimée par des mutations sur le résidu 160 de TonB (Heller *et al.*, 1988; Schoffler et Braun, 1989; Bell *et al.*, 1990).

E. coli est aussi capable d'utiliser les sidérophores hétérologues (citrate, ferrichrome, et coprogène). L'importation de Fe^{3+} par le citrate est induit par la présence du citrate dans le milieu, ce transport se fait par l'intermédiaire des protéines codées par les gènes de l'opéron *fec* (Van Hove *et al.*, 1990). Sa protéine réceptrice FecA reçoit également l'énergie du complexe protéique TonB, ExbB et ExbD.

7.4. Les protéines et systèmes impliqués dans le transport du fer ferreux (Fe^{2+}) chez *E. coli*

En absence d'oxygène, le fer ferreux (Fe^{2+}) est très stable et plus soluble que le fer ferrique (Fe^{3+}), ce qui lui permet de traverser la membrane externe par diffusion passive sans être complexé aux sidérophores. Chez *E. coli* et *S. typhimurium*, le fer ferreux est transporté par un système de transport à haute affinité codé par l'opéron *feoABC* (Kammler *et al.*, 1993; Tsohis *et al.*, 1996). Ces trois gènes, *feoABC* (Kammler *et al.*, 1993; Hantke, 1997) ont été récemment identifiés. *feoA* et *feoC* codent pour des petites protéines (10kDa) de fonctions inconnues, *feoB* code pour une protéine de 84kDa

localisée dans la membrane cytoplasmique. L'analyse de la séquence de FeoB identifie un motif de liaison à l'ATP sur son extrémité N-terminale, ce qui laisse penser que le transport de Fe^{2+} par FeoB est un processus qui consomme l'énergie fournie par l'ATP.

Par ailleurs, CorA une protéine de la membrane cytoplasmique responsable du transport de Mg^{2+} chez *E.coli* et *S.typhimurium* (Gibson *et al.*, 1991), est aussi un transporteur à faible affinité de Fe^{2+} chez *E. coli* en absence de Mg^{2+} (Hantke, 1997).

7.5. La protéine Fur (ferric uptake regulation) est un régulateur de plusieurs systèmes de transport chez *E. coli*

7.5.1. Fur: répresseur des gènes de transport de fer

Fur est une métalloprotéine régulatrice de 147 acides aminés avec une masse moléculaire de 17kDa (Bagg et Neilands, 1987; Saito *et al.*, 1991). Elle agit comme répresseur transcriptionnel sur les promoteurs de gènes régulés par le fer (Archibald, 1983 ; De Lorenzo *et al.*, 1987 ; Escolar *et al.*, 1997). Sous des conditions riches en fer, Fur se lie au Fe^{2+} et prend une conformation qui lui permet de se lier sur la boîte Fur (la séquence de cette boîte est de type: 5' GATAATGATAATCATTATC 3' se trouvant sur le promoteur des gènes qu'il contrôle. Fur inhibe ainsi la transcription de tous les gènes et opérons réprimés par le fer. Sous des concentrations limitantes en fer, Fe^{2+} se dissocie de la protéine Fur chez les bactéries gram négative, et le répresseur devient inactif. L'ARN polymérase a alors accès aux promoteurs, ce qui permet la transcription et l'expression des gènes responsables entre autres de la biosynthèse des sidérophores et de l'acquisition du fer (Griggs *et al.*, 1987; Klebba *et al.*, 1982). Par des expériences d'empreintes à la DNase sur la région du promoteur des gènes de biosynthèse des aerobactins, il a été démontré *in vitro* que la liaison de Fur à l'ADN est aussi médiée par d'autres cations divalents comme Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} et Cd^{2+} (De Lorenzo *et al.*, 1987; Bagg et Neilands, 1987).

7.5.2. Les autres rôles joués par Fur

L'étude des gènes régulés par Fur révèle que cette protéine participe aussi à des fonctions qui ne sont pas directement liées au métabolisme de fer. Ainsi, Fur est impliquée dans la production des toxines et d'autres facteurs de virulences (Litwin et Calderwood, 1993), dans la défense contre les radicaux oxygénés. Des études démontrent que Fur réprime certains gènes induits en réponse au stress oxydatif, comme la Mn-SOD de *E. coli* (Niederhoffer *et al.*, 1990; Tardat et Touati, 1993). Fur réprime une variété de déterminants de virulence tels l'exotoxine A de *P.aeruginosa* et l'hémolysine de *Vibrio cholerae* (Litwin *et al.*, 1992; Prince *et al.*, 1993). Cependant certaines études indirectes récentes rapportent que Fur n'est pas seulement un régulateur négatif, mais peut aussi réguler positivement l'expression de certains promoteurs. Il a été proposé que l'expression de *sodB*, est positivement contrôlé par Fur (Niederhoffer *et al.*, 1990)

L'abondance de la protéine Fur, principalement durant la phase stationnaire Chez *vibrio* soit 7500 molécules par cellule (Watnick *et al.*, 1997) et son implication dans plusieurs fonctions cellulaires indiquent que cette protéine serait plutôt un régulateur général qu'un répresseur spécifique.

Discussion et Conclusion

Des tests de diffusion effectués avec le mutant *hflB1* exprimant la protéine MntH de *E. coli* ont permis d'identifier le produit du gène *mntH* comme un nouveau transporteur de cations métalliques divalents qui permet l'acquisition de Mn^{2+} et de Fe^{2+} . Ce transporteur facilite aussi l'accumulation intracellulaire d'autres cations divalents tels que Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et très faiblement le Ni^{2+} et Cu^{2+} (Tableau 1). D'autres études de transport effectuées dans notre laboratoire utilisant des cations divalents radioactifs ont permis de montrer directement que MntH transporte le Mn^{2+} et le Fe^{2+} . Ce transport est dépendant du gradient électrochimique de proton et est inhibé par le Cd^{2+} . Ensemble, ces résultats démontrent que MntH représente l'homologue fonctionnel des protéines eucaryotes de types Nramp, car à la conservation des séquences correspondent des fonctions similaires. En effet les protéines de levure (Smf1) et de mammifères (Nramp2) sont des co-transporteurs de métaux (Fe^{2+} , Mn^{2+}) et de protons.

L'analyse de la séquence génomique de la région du gène *Nramp* de *E. coli* (*mntH*), antérieurement nommé *yfeP* à cause de sa localisation chromosomique estimée sur la carte génétique à 54 minutes (Blattener *et al.*, 1997), montre que le gène *mntH* est adjacent au 5' du gène *nupC* qui code pour une perméase de nucléosides. Cet arrangement a été aussi observé chez *S. typhimurium*. Le gène adjacent en 3' dénommé *yfeO*, pourrait coder pour un transporteur de chlorure. Le fait que *mntH* soit transcrit dans le sens inverse de deux gènes voisins, ainsi que l'absence de similarité dans les fonctions de transport de ces trois gènes suggèrent que *mntH* ne fait pas partie d'un opéron. Ainsi, les phénotypes observés dans la souche *hflB1 / mntH*, soit l'absence de pousse à 42⁰C en présence de chélateur (comparer figure 2 de l'article, 2 CD et 2 EF), et la restauration de la pousse à 42⁰C moins efficace en présence de Mn^{2+} (comparer figure 4A de l'article, photo de gauche et du centre) sont certainement dus à la mutation dans le gène *mntH* et non pas à un effet polaire. Ces résultats suggèrent que MntH contribue physiologiquement à l'acquisition d'ions métalliques tels que Mn^{2+} et Fe^{2+} . Cette fonction de transport de métaux est apparemment conservée chez les bactéries puisque des résultats obtenus dans le laboratoire montrent que le gène *mntH* de *B. subtilis* facilite sélectivement l'acquisition du manganèse.

Par ailleurs le gène *Nramp* de *M. tuberculosis* vient d'être analysé au niveau moléculaire. Des études *in vitro* montrent que la surexpression de la protéine correspondante dans les œufs de xénope induit une accumulation de Fe^{2+} et de Zn^{2+} dépendante du pH. Ce transport est inhibé par le Mn^{2+} et le Cu^{2+} , suggérant que *Nramp* de *M. tuberculosis* pourrait favoriser l'accumulation intracellulaire de ces ions (Agranoff *et al.*, 1999). L'existence d'un gène *Nramp* fonctionnel chez les bactéries intracellulaires vient appuyer l'hypothèse de compétition entre les homologues *Nramp* au niveau du phagosome (Figure 3). L'expression des homologues de *Nramp* par ces parasites faciliterait l'acquisition des métaux, notamment le fer et le manganèse qui serviraient à leur croissance et à leur survie chez l'hôte. Cependant, le gène existe aussi chez des bactéries non pathogènes comme *M. smegmatis*, suggérant un rôle plus général dans la résistance au stress. Des études additionnelles seront nécessaires pour démontrer le rôle possible de MntH dans la pathogenèse infectieuse.

Des travaux additionnels seront nécessaires pour établir avec certitude le substrat physiologique de MntH. L'affinité apparemment plus élevée de MntH pour le Mn^{2+} par rapport au Fe^{2+} , et le fait que MntH soit le seul transporteur de Mn^{2+} identifié à ce jour chez *E. coli*, suggèrent que le rôle physiologique de MntH est de permettre l'acquisition du manganèse. Cependant le phénotype dû à l'élimination de ce gène en regard du métabolisme du Mn^{2+} reste à établir car, aucun besoin essentiel pour la croissance *in vitro* n'est connu chez *E. coli*. Néanmoins, l'existence d'un système de transport à haute affinité pour le Mn suggère un rôle crucial pour le transport de ce métal.

Le rôle de Mn^{2+} le plus connu et le mieux compris chez les bactéries est celui comme cofacteur dans l'isoforme de la SOD (Mn-SOD, *sodA*) chez la majorité des bactéries, et de la Mn-catalase de *Lactobacillus*. La SOD et la catalase permettent la résistance des bactéries contre les radicaux oxygénés générés par auto-oxydation des composés de la chaîne respiratoire (O_2^- et H_2O_2). Ces métalloenzymes permettent à la bactérie de survivre durant la phase stationnaire. Au cours de cette phase, l'arrêt de la croissance causé par le manque de nutriments déclenche la production d'enzymes et protéines de réponse au stress oxydatif, qui rendent les cellules plus résistantes aux

peroxyde d'hydrogène (Jenkins et al., 1988; 1991; Matin, 1991; Nyström, 1996). Ces espèces oxygénées réactives peuvent endommager l'ADN, oxyder les protéines et les acides gras de la membrane, et de cette façon, initier la peroxydation des lipides. *E. coli* synthétise beaucoup de Mn-SOD pour maintenir à un niveau stable la quantité de O₂-d'environ 10⁻¹⁰M (Gort et Imlay, 1998). Finalement, comme le Mn²⁺ peut agir directement contre les effets toxiques des peroxides sans être complexé à la SOD chez *Lactobaccillus* (Stadman et al., 1990 ; Yim et al., 1990 ; Archibald et Fridovich, 1982), on pourrait penser que le transport préférentiel de Mn²⁺ par MntH chez *E. coli* pourrait lui permettre d'avoir une protection supplémentaire contre les radicaux oxygénés en plus de la SOD et de la catalase.

Le Mn²⁺ est aussi un cofacteur des phosphatases de la classe PPP. Les phosphatases de la classe PPP sont des enzymes clés dans la transduction de signaux intracellulaires (Yocum et Pecoraro, 1999; Barford, 1995; Jia, 1997) chez les procaryotes et les eucaryotes, et sont stimulées par le Mn²⁺. Chez *E. coli*, les deux phosphatases PrpA et PrpB modulent l'activité de CpxAR et par le fait même régulent les protéases périplasmique en réponse au stress. Ainsi MntH pourrait contribuer d'une manière générale à la résistance au stress chez *E. coli* notamment résistance durant les interactions des bactéries avec leurs hôtes.

Alternativement le rôle de MntH pourrait être de transporter à la fois le fer et le manganèse. La différence apparente d'affinité peut correspondre à la différence d'abondance de Fe²⁺ par rapport au Mn²⁺ dans l'environnement, et il serait logique d'être plus affine pour l'élément le moins abondant. L'absence de phénotype observé, associé au mutant *mntH* de *E. coli* (422) pourrait s'expliquer par le fait que de nombreux autres transporteurs de fer pourraient compléter le déficit en MntH. En effet l'observation que le triple mutant de *E. coli* (*feoB*, *tonB* et *aroB*) survit et peut quand même coloniser l'intestin suppose l'existence d'un système d'acquisition de fer additionnel qui permet la croissance bactérienne (Hantke, 1997). Comme il a été observé qu'il y a augmentation d'activité réductrice extracellulaire dans un mutant tel que *feoB*, *tonB* et *aroB* (Vartivarian et Cowart, 1999), MntH serait un bon candidat comme système d'acquisition

de fer ferreux. MntH pourrait notamment permettre aux entérobactéries qui l'expriment d'acquérir le fer dans un environnement où le fer existe sous forme ferreuse, tel que dans l'intestin en l'absence d'oxygène (Camelissen et Sparling, 1994). En anaérobiose, le fer reste plus généralement sur sa forme réduite (Fe^{2+}), donc un système additionnel de transport de Fe^{2+} chez *E. coli* peut refléter les conditions particulières d'existence à ce niveau.

L'extraordinaire redondance de systèmes d'absorption de fer observés chez *E. coli* pourrait expliquer sa grande capacité d'adaptation et de survie dans les environnements très variés, ce qui se reflète par son génome de taille substantielle. D'autres bactéries qui possèdent un gène *Nramp* ont un génome assez gros, cette multitude de systèmes de transport de fer est aussi remarquée chez d'autres bactéries opportunistes comme *S. typhimurium*, *Y. pestis* et *P. aeruginosa*. Cette caractéristique leur permet de s'adapter à différents environnements (Rhame *et al.*, 1997). Généralement les bactéries opportunistes profitent de l'excès de fer résultant par exemple d'un désordre métabolique dans leur hôte pour générer des maladies. Les bactéries possédant l'homologue de MntH de *E. coli* comme *Yersinia* (Jurado, 1997) les mycobactéries (Dholphe *et al.*, 1996; Moyo *et al.*, 1997) et Salmonelle ont un tropisme pour les régions de l'organisme riches en fer, tel que l'intestin et les macrophages. Par analogie, nous suggérons que la protéine MntH faciliterait le transport du fer, et ou de manganèse ou même d'autres ions pour les pathogènes opportunistes.

Chez les bactéries, il est assez fréquent qu'un transporteur de cations ne soit pas très spécifique au métal. MntH transporte préférentiellement le Mn^{2+} mais aussi le Cd^{2+} et d'autres ions. Le système de transport de Mn^{2+} de *Lactobacillus plantarum* est sensible au gradient de protons et transporte le Cd^{2+} (Archibald, 1986, Hao *et al.*, 1999). *Corynebactérium ammoniagenes* possède un système de transport de Mn^{2+} dépendant d'énergie qui est de manière compétitive inhibé par le Cd^{2+} et Zn^{2+} . Le système de transport de Mn^{2+} de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* est aussi le transporteur du Cd^{2+} (Weiss *et al.*, 1978). De prime à bord, les transporteurs de Mn^{2+} semblent transporter aussi le Cd^{2+} , et vice versa. Le fait qu'un transporteur de Mn^{2+} accumule aussi

le Cd^{2+} semble assez fréquent chez les bactéries. Contrairement à Mn^{2+} , Cd^{2+} n'est pas un substrat physiologique, c'est un métal extrêmement toxique, dans les systèmes biologiques. Il exerce sa toxicité en se liant au groupement sulfhydryl des protéines et aussi brise l'ADN simple brin (Foster, 1983 ; Mita et Bernstein, 1978). Nos résultats montrent que MntH pourrait aussi transporter d'autres métaux comme le Co^{2+} , cofacteur de la vitamine B_{12} , le Zn^{2+} , ce dernier est un co-facteur important d'enzymes et de facteurs de transcription.

La distribution phylogénique montre que *Nramp* / *mntH* est d'origine ancestral, puisque plusieurs espèces éloignées d'eubactéries ont une copie sur leur chromosome : on retrouve ce gène chez les bactéries Gram négatifs et positifs, et présentant des niveaux de similarité consistants avec les données connues sur le degré de parenté entre les espèces comme *E. coli*, Salmonelle, *Yersinia*, et *B. subtilis*. De plus, ce gène est aussi présent dans un groupe de bactéries qui a divergé il y a très longtemps (*D. radiodurans*). Puisque ce gène est également très conservé chez les eucaryotes, ces résultats pourraient suggérer l'apparition de la famille MntH/Nramp avant l'émergence des eucaryotes. À l'exception du groupe des Archaeobactéries chez lesquelles les homologues du gène *Nramp* n'ont pas été identifiés jusqu'à ce jour, presque toutes les bactéries qui possèdent un gène *Nramp/mntH* n'ont qu'une copie du gène. Deux espèces *C. acetobutylicum*, et *P. aeruginosa* possèdent deux gènes *mntH* (*mntH-1-2*). Curieusement, les deux gènes de *Pseudomonas* ne présentent pas des niveaux de similarité avec les autres eubactéries Gram négatif, ce qui suggère la possibilité d'un transfert latéral.

L'étude de la régulation du gène permettra de mieux comprendre le rôle de MntH. Des expériences ont été entreprises dans notre laboratoire dans ce but. Il sera important d'évaluer l'effet du DP (dipyridyl qui est un chélateur d'ions Fe^{2+} et Mn^{2+}) sur la régulation de *mntH* au niveau chromosomique. La présence d'une région pouvant probablement lier la boîte Fur dans la région du promoteur de *mntH* suggère que Fur réprimer la transcription de *mntH* (résultats non montrés). De plus certains composés comme le peroxyde d'hydrogène, le paraquat, et d'autres composés oxydants peuvent aussi réguler Fur et pourrait moduler l'expression de *mntH*.

Cette étude nous a permis de démontrer qu'il existe un homologue fonctionnel de Nramp chez *E.coli*. La protéine MntH transporte sélectivement les cations métalliques divalents de manière dépendante du gradient de protons, avec une préférence pour le manganèse. Cette étude a démontré que la surexpression de MntH dans le mutant thermosensible (*hflB1*) est une approche valide. Cet outil expérimental nous a permis de découvrir le premier transporteur de Mn^{2+} chez *E. coli*.

L'identification de MntH comme transporteur de métaux pourrait permettre de mieux comprendre la pathogénèse associée à des maladies causées par des bactéries opportunistes comme *E. coli* et *P. aeruginosae*. Cependant pour mieux comprendre le rôle de MntH dans le transport du Fe^{2+} et son implication dans certaines maladies, il faudra créer une souche mutante dans les gènes *tonB*, *feoAB*, *aroB*, et *mntH*.

Finalement, la protéine MntH et le double mutant de *E.coli* *hflB1 / mntH* pourront servir comme modèle pour élucider la structure de cette famille de protéine et permettre l'étude de la régulation et des conditions naturelles d'expression du gène.

Remerciements

Je remercie le Docteur Mathieu Cellier, mon directeur de recherche qui m'a permis de faire ma maîtrise dans son laboratoire où j'ai pu me familiariser avec les techniques de biologie moléculaire. Je le remercie aussi d'avoir dirigé mes travaux par ses sages conseils et de m'avoir fourni toutes les facilités matérielles pour mener à terme mon projet. Je le remercie également de son soutien financier sans lequel je n'aurais pas pu faire ma maîtrise.

Je remercie M. Jacques Beaubien, le technicien de notre laboratoire pour ces conseils lors de mes manipulations et pour son humour qui savait si bien harmoniser son entourage. Je remercie aussi tous les étudiants de notre laboratoire.

Finalement je remercie tous les membres de ma famille plus spécialement mon oncle Djambong Michel, ma tante Meubihi Justine et ma chère mère Tchelassie Jeanne qui m'ont beaucoup supporté financièrement au début de mes études au Canada. Je remercie aussi mon amie Lowe Lydia Helena qui a su m'encourager et me supporter au début de ma maîtrise, un début qui fut très difficile.

Bibliographie

- Abel, L., Sanchez, F.O., Oberti, J., Thuc, N.V., Hoa, L.V., Lap, V.D., Skamene, E., Lagrange, P.H., et Schurr, E. (1998) Susceptibility to leprosy is linked to the human *NRAMP1* gene. *J Infect Dis* **177**: 133-145.
- Agranoff, D., Monahan, I.M., Mangan, J.A., Butcher, P.D., et Krishna, S. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *J Exp Med* **190**: 717-724.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST et PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Archibald, F. et Fridovich, I., (1982) The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* **214**: 452-463.
- Archibald, F. (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol Lett* **19**: 29-32.
- Archibald, F. (1986) Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol* **13**: 63-109.
- Armstrong, S.K., Pettis, G.S., Forrester, L.J., et McIntosh. (1989) The *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis gene *entD*: nucleotide sequence and membrane localization of its protein product. *Mol Microbiol* **3**: 757-766.
- Arouma, O., et Halliwell, B. (1998) *Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases*. Saint Lucia: OICA International.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., et Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons.

- Bannerman, R.M., Edwards, J.A., Kreimer-Birnbaum, M., McFarland, E., et Russell, E.S. (1972) Hereditary microcytic anaemia in the mouse; studies in iron distribution and metabolism. *Br J Haematol* **23**: 235-
- Bagg, N., et Neilands, J.B. (1987) Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**: 509-518.
- Bassford, P.J., Bradbeer, C., Kadner, R.J., et Schnaitman, C.A. (1976) Transport of vitamin B12 in tonB mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **128**: 242-247.
- Barford, D. (1995) Protein phosphatases. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 728-734.
- Bartsevich, V.V., et Pakrasi, H.B., (1995) Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese: analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *EMBO J* **14**: 1845-1853.
- Battistoni, A., Folcarelli, S., Cervoni, L., Polizio, F., Desideri, A., Giartosio, A., et al (1998) Role of the dimeric structure in Cu, Zn superoxide dismutase. PH-dependent, reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **273**: 5655-5661.
- Bearden, S.W., et Perry, R.D. (1999) The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol* **32**: 403-414.
- Beckman, J., Beckman, T., Chen, J., Marshall, P., et Freeman, B. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1620-1624.

- Bell, P.E., Nau, C.D., Brown, J.T., Konisky, J., et Kadner, R.J. (1990) Genetic suppression demonstrates interaction of TonB protein with outer membrane transport proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 3826-3829.
- Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, K.P., Whittle, H.C., et Hill, A.V. (1998) Variations in the *NRAMP1* gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *New Engl J Med* **338**: 640-644.
- Benov, L., Chang, L.Y., Day, B., et Fridovich, I. (1995) Copper Zinc superoxide dismutase in *Escherichia coli*: periplasmic localisation. *Arch Biochem Biophys* **319**: 508-511.
- Benov, L., et Fridovich, I. (1994) *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* **269**: 25310-25314.
- Beveridge, T.J., Hughes, M.N., Lee, H., Leung, K.T., Poole, R.K., Savvaidis, I., Silver, S., et Trevors, J.T. (1997) Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Adv Microb Physiol* **38**: 177-243.
- Beyer, W.F., et Fridovich, I. (1991) In vivo competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**: 303-308.
- Bhattacharyya, P. (1970) Active transport of manganese in isolated membranes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **104**: 1307-1311.
- Bhattacharyya, P. (1975) Active transport of manganese in isolated membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **123**: 123-127.
- Bjorn, M., Iglewski, B.H., Sadoff, J., and Vasil, M.L. (1978) Effect of iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA103. *Infect Immun* **19**: 785-791.

- Blattner, F.R., Plunkett, III, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Bonhivers, M., Ghazi, A., Boulanger, P., et Letellier, L. (1996) FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5. *EMBO J* **15**: 1850-1856.
- Borges, V.M., Vannier-Santos, M.A., et de Souza, W. (1998) Subverted transferrin trafficking in *Leishmania* infected macrophages. *Parasitol Res* **84**: 811-822.
- Bradbeer, C. (1993) The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 3146-3150
- Braun, V., et Herrmann, C. (1993) Evolutionary relationship of uptake systems for biopolymers in *Escherichia coli*: cross-complementation between the TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR proteins. *Mol Microbiol* **8**: 261-268.
- Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev* **16**: 295-307.
- Braun, V., Hantke, K., et Köster, W. (1998) Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst* **35**: 67-145.
- Braun, V., et Killmann, H. (1999) Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends Biochem Sci* **24**: 104-109.
- Breuer, W., Epsztejn, S., et Cabantchik, Z.I. (1995) Iron acquired from transferrin by K562 cells is delivered into a cytoplasmic pool of chelatable iron(II). *J Biol Chem* **270**: 24209-24215.

- Brickman, T.J., McIntosh, M.A. (1992) Overexpression and purification of ferric Enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex. *J Biol Chem* **267**: 12350-12355.
- Bridges, K.R. (1990) Modulation of the availability of iron . In P. Ponka, H.M. Shulman, and R.C. Woodsworth (ed.), Iron storage and transport. CRC Press, Boca Raton, Fla.pp 297-314.
- Brown, I. N., Glynn, A.A., et Plant, J. (1982) Inbred mouse strain resistance to *Mycobacterium lepraemurium* follows the Ity/Lsh pattern. *Immunology* **47**: 149-156.
- Brown, J.R., et Doolittle, W.F. (1997) *Archaea* and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 456-502.
- Byers, B.R., et Arceneaux, J.E.L. (1998) Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. *Met Ions Biol Syst* **35**: 37-66.
- Calderwood, S.B., et Mekalanos, J.J. (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* mediated by the *fur* locus. *J Bacteriol* **169**: 4759-4764.
- Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., et Gros, P. (1999) Cellular and subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood* **93**: 4406-4417.
- Canvin, J., Langford, P.R., Wilks, K.E., et Kroll, J.S. (1996) Identification of *sodC* encoding periplasmic [Cu,Zn]-superoxide dismutase in *Salmonella*. *FEMS Microbiol Lett* **136**: 215-220.
- Cellier, M., Govoni, G., Vidal, S., Kwan, T., Groulx, N., Liu, J., Sanchez, F., Skamene, E., Schurr, E., et Gros, P. (1994) Human natural resistance-associated macrophage protein:

- cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J Exp Med* **180**: 1741-1752.
- Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., et Gros, P. (1995) Nramp defines a family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10089-10093.
- Cellier, M., Belouchi, A., et Gros, P. (1996) Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends in Genet* **12**: 201-204.
- Cellier, M., et Gros, P. (1997) Le gène *Nramp1*: résistance aux infections intracellulaire et activité antimicrobienne des phagocytes. *Médecine sciences* **13**: 501-508.
- Chen, X.-Z., Peng, J.-B., Cohen, A., Nelson, H., Nelson, N., et Hediger, M.A. (1999) Yeast SMF1 Mediates H⁺-coupled Iron Uptake with Concomitant Uncoupled Cation Currents. *J Biol Chem* **274**: 35089-35094.
- Christianson, D.W. (1997) Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes. *Prog Biophys Mol Biol* **67**: 217-252.
- Chua, A.C., Stonell, L.M., Savigni, D.L., et Morgan, E.H. (1996) Mechanisms of manganese transport in rabbit erythroid cells. *J Physiol (Lond)* **493**: 99-112.
- Clemens, D.L., et Horwitz, M.A. (1995) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* **181**: 257-270.
- Cornelissen, C., et Sparling, P. (1994) Iron piracy: Acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol* **14**: 843-850.

- Crichton, R.R., et Charlotheaux-Wauters, M. (1987) Iron transport and storage. *Eur J Biochem* **164**: 485-506.
- Crocker, P.R., Davies, V.E., et Blackwell, M.J. (1987) Variable expression of the murine natural resistance gene *Lsh* in different macrophage populations infected in vitro with *Leishmania donovani*. *Parasite Immunol* **9**: 705-719.
- Crosa, J.H. (1989) Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol Rev* **53**: 517-530.
- Crosa, J.H. (1997) Signal transduction and transcriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 319-336.
- Darke, D., Taylor, K.G., et Doyle, R.J. (1988) Expression of the glucan-binding lectin of *Streptococcus cricetus* requires manganous ion. *Infect Immun* **56**: 2205-2207.
- De Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., et Neilands, J.B. (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV.K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol* **169**: 2624-2630.
- Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Gervais, F., et Skamene, E. (1990) Killing of *Mycobacterium smegmatis* by macrophages from genetically susceptible and resistant mice. *J Leukocyte Biol* **47**: 25-30
- Deretic, V., et Fratti, R.A. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Mol Microbiol* **31**: 1603-1609.
- Desjardins, M. (1995) Biogenesis of phagolysosomes: the « kiss and run » hypothesis. *Trends Cell Biol* **5**: 183-186.

- Dhople, A.M., Ibanez, M.A., et Poirier, T.C. (1996) Role of iron in the pathogenesis of *Mycobacterium avium* infection in mice. *Microbios* **87**: 77-87.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., Claverys, J.-P. (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: *Adc* and *PsaA* mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* **25**: 727-939.
- D'Souza, J., Cheah, P.Y., Gros, P., Chia, W., et Rodrigues, V. (1999) Functional complementation of the malvolio mutation in the taste pathway of *Drosophila melanogaster* by the human natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1). *J Exp Biol* **202**: 1909-1915.
- Escolar, L., de Lorenzo, V., et Pérez-Martin, J., (1997) Metalloregulation *in vitro* of the aerobactin promoter of *Escherichia coli* by Fur (ferric uptake regulation) protein. *Mol Microbiol* **26**: 799-808.
- Fang, F.C., DeGroote, M.A., Foster, J.W., Baumler, A.J., Ochsner, U., Testerman T., Bearson, S., Giard, J.C., Xu Y., Campbell, G., et Laessig, T. (1999) Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **22**: 7502-7
- Farrant, J.L., Sansone, A., Canvin, J.R., Pallen, M.J., Langford, P.R., Wallis, T.S., et al. (1997) Bacterial copper-and zinc-cofactored superoxide dismutase contributes to the pathogenesis of systemic salmonellosis. *Mol Microbiol* **25**: 785-796.
- Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K., et Welte, W., (1998) Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**: 2215-2220.

- Fleming, M.D., Trenor, C.C. 3rd, Su, M.A., Foernzler, D., Beier, D.R., Dietrich, W.F., et Andrews, N.C. (1997) Microcytic anaemia mice have a mutation in *Nramp2*, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* **16**: 383-386.
- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., et Andrews, N. C. (1998) *Nramp2* is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for *Nramp2* in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1148-1153.
- Fontecave, M., coves, J., et Pierre, J.-L (1994) Ferric reductases or flavin reductases. *BioMetals* **7**: 3-8.
- Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Mialhe, A.-C., et Turcotte, R. (1981) Difference in response among inbred mouse strains to infection with small dose of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect immun.***22**: 42-47.
- Foster, T.J. (1983) Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev* **47**: 361-409.
- Franza, T., Sauvage, C., et Expert, D. (1999) Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 119-128.
- Frausto da Silva, J.J.R., et Williams, R.J.P. (1991) The Biological Chemistry of the Elements: The inorganic Chemistry of Life. Oxford University Press, New York.
- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**: 875-880.
- Garcia-del Portillo, F., et Finlay, B.B. (1995) The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol* **3**: 373-380.

- Genco, C.A., et Desai, P.J. (1996) Iron acquisition in the pathogenic *Neisseria*. *Trends Microbiol* **4**: 179-184.
- Gibson, M.M., Bagga, D.A., Miller, C.G., et Maguire M.E. (1991) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: the influence of new mutations conferring Co^{2+} resistance on the CorA Mg^{2+} transport system. *Mol Microbiol* **5**: 2753-2762.
- Gomes, M.S., et Appelberg, R. (1998) Evidence for a link between iron metabolism and Nramp1 gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. *Immunology* **95**: 165-168.
- Gort AS et Imlay JA. (1998) Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J Bacteriol.* **180**: 1402-10.
- Goto, Y., Buschman, E., et Skamene, E. (1989) Regulation of host resistance to *Mycobacterium intracellulare* in vivo and in vitro by the Bcg gene. *Immunogenetics* **30**: 218-221.
- Govoni, G., Vidal, S., Cellier, M., Lepage, P., Malo, D., et Gros, P. (1995) Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse *Nramp1* gene in macrophages. *Genomics* **27**: 9-19.
- Govoni, G., Vidal, S., Gauthier, S., Skamene, E., Malo, D., et Gros, P. (1996). The *Bcg/Ity/Lsh* locus: genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the *Nramp*^{Gly169} allele. *Infect. Immun.* **64**: 2923-2929.
- Govoni, G., Canonne-Hergaux, F., Pfeifer, C.G., Marcus, S.L., Mills, S.D., Hackam, D.J., Grinstein, S., Malo, D., Finlay, B.B., et Gros, P. (1999) Functional expression of Nramp1 in vitro in the murine macrophage line RAW264.7. *Infect Immun* **67**: 2225-2232.

- Gray-Owen, S.D., et Schryvers, A.B. (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* **4**: 185-191.
- Griggs, D.W., Tharp, B.B., et Konisky, J. (1987) Cloning and promoter identification of the iron-regulated *cir* gene of the *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 5343-5352.
- Gros, P., Skamene, E., et Forget, A. (1981) Genetics control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol* **127**: 2417-2421.
- Gros, P., Skamene, E., et Forget, A. (1983) Cellular mechanisms of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Immunol* **131**: 1966-1972
- Gruenheid, S., Cellier, M., Vidal, S., et Gros, P. (1995) Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics* **25**: 514-525.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., et Gros, P. (1997) Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* **185**: 717-730.
- Gruenheid, S., Canonne-Hergaux, F., Gauthier, S., Hackam, D.J., Grinstein, S., et Gros, P. (1999) The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* **189**: 831-841.
- Guerinot, M.L. (1994) Microbial iron transport. *Annu Rev Microbiol* **48**: 743-772.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., et Hediger, M.A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488.

- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., et Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121-4130.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W.-J., Demaurex, N., Woodside, M., Tsai, O., et Grinstein, S. (1997) regulation of phagosomal acidification. *J Biol Chem* **272**: 29810-29820.
- Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Zhang, W., Gruenheid, S., Gros, P., et Grinstein, S. (1998) Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* **188**: 351-364.
- Han, O., Fleet, J., et Wood, R. (1998) Reciprocal regulation of HFE and Nramp2 gene expression by iron in human intestinal cells. *FASEB J* **12**: A280.
- Hantke, K., et Braun, V. (1978) Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **135**: 190-197.
- Hantke, K. (1997) Ferrous iron uptake by a magnesium transport system is toxic for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **179**: 6201-6204.
- Hannavy, K., Barr, G.C., Dorman, J.C., Adamson, J., Mazengera, L.R., Gallagher, M.P., Evans, J.S., Levine, B.A., Trayer, L.P., et Higgins, M.P. (1990) TonB protein of *Salmonella typhimurium*. A model for signal transduction between membrane. *J Mol Biol* **216**: 897-910.
- Hao, Z., Chen, S., et Wilson, D.B. (1999) cloning, expression, and characterisation of cadmium and manganese uptake gene from *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4746-4752.

- Harford, J.B., Rouault, T.H., Huebers, H.A., et Klausner, R.D. (1994) Molecular mechanisms of iron metabolism. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majems PW, Varmus H, editors. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia:WB Saunders; pp351-378.
- Harris, W.R. (1983) Thermodynamic binding constants of the zinc-human serum transferrin complex. *Biochemistry* **22**: 3920-3926.
- Harris, W.R., et Chen, Y. (1994) Electron paramagnetic resonance and difference ultraviolet studies of Mn²⁺ binding to serum transferrin. *J Inorg Biochem* **54**: 1-19.
- Harrison, P.M., et Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biophys Acta* **1275**: 161-303.
- Hassan, H.M., et Fridovich, I. (1978) Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **253**: 8143-8148.
- Heller, K.J., Kadner, R.J., et Günter, K. (1988) Suppression of the *btuB451* mutation by mutations in the *tonB* gene suggests a direct interaction between TonB and TonB-dependent receptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene* **64**: 147-153.
- Herman, C., Thévenet, D. , D'Ari, R., et Boulloc, P. (1995a) Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3516-3520.
- Herman, C., Lecat, S., D'Ari, R., et Boulloc, P. (1995b) Regulation of the heat-shock response depends on divalent metal ions in an *hflB* mutant of *Escherichia coli*. *Molec Microbiol* **18**: 247-255.

- Hori, H., Tsubaki, M., Mogi, T., et Anraku, Y. (1996) EPR study of No complex of bd-type ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**: 9254-9258.
- Jackson, S., et Burrows, T.W. (1956) The virulence-enhancing effect of iron on nonpigmented mutants of virulent strains of *Pasteurella pestis*. *Br J Exp Pathol* **37**: 577-583.
- Janakiraman, A., et Slauch, J.M. (2000) The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molec Microbiol* **35**: 1146-1155.
- Jenkins, D.E., Schultz, J.E., et Matin, A. (1988) Starvation-induced cross protection against heat or H₂ O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **170**: 3910-3914.
- Jenkins, D.E., Auger, E. A., et Matin, A. (1991) Role of RpoH, a Heat Shock Regulator Protein, in *Escherichia coli* Carbon Starvation Protein Synthesis and Survival. *J Bacteriol* **173**: 1992-1996.
- Jia, Z. (1997) Protein phosphatases: structures and implications. *Biochem Cell Biol* **75**: 17-26.
- Jurado, R. L. (1997) Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis* **25**: 888-895.
- Kammler, M., Schon, M., et Hantke, K. (1993) Characterisation of the ferrous iron uptake system of the *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **175**: 6212-6219.
- Klausner, R.D., Rouault, T. A., et Harford, J. B. (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**: 19-28.

- Klebba, P.E., McIntosh, M.A., et Neilands, J.B. (1982) Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **149**: 880-888.
- Kolenbrander, P.E., Andersen, R.E., Baker, R.A., et Jenkinson, H.F. (1998) The adhesion-associated *sca* operon in *Streptococcus gordonii* encodes an inducible high-affinity ABC transporter for Mn²⁺ uptake. *J Bacteriol* **180**: 290-295.
- Kroll, J.S., Langford, P.R. et Loynds, B.M. (1991) Copper-zinc superoxide dimutase of *Haemophilus influenzae* and *H. parainfluenzae*. *J Bacteriol* **173**: 7449-7457.
- Kumar, S., Tamura, K., et Masatoshi, N. (1993) Molecular Evolutionary Genetics Analysis. In *MEGA, version 1.01*. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802.
- Larsen, R.A., Myers, P.S., Skare, J.T., Seachrd, C.L., Darveau, R.P., et Postle, K. (1996) Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependant energy transduction complexes. *J Bacteriol* **178**: 1363-1373.
- Link, A.J., Phillips, D., et Church, G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol* **179**: 6228-6237.
- Lissner, C.R., Swanson, R.N., et O'Brien, A.D. (1983) Genetic control of the innate resistance to mice to *Salmonella typhimurium*: Expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. *J Immunol* **13**: 3006-3013
- Litwin, C.M., Boyko, S.A., et Calderwood, S.B. (1992) Cloning, sequencing, and transcriptional regulation of the *Vibrio cholerae fur* gene. *J Bacteriol* **174**: 1897-1903.
- Litwin, M., et Calderwood (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137-149.

- Liu, X.F., Supek, F., Nelson, N., et al. (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* *BSD2* gene. *J Biol Chem* **272**: 11763-11769.
- Lundrigan, M.D., Arceneaux, E.L., Zhu, W., et Byers, B.R. (1997) Enhanced hydrogen peroxide sensitivity and altered stress protein expression in iron-starved *Mycobacterium smegmatis*. *Biometals* **10**: 215-225.
- Malo, D., Vogan, K., Vidal, S., Hu, J., Cellier, M., Schurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K., et Gros, P. (1994) Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* **23**: 51-61.
- Matin, A. (1991) The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 3-10.
- Matzanke, B.F., Berner, I., Bill, E., Trautwein, A.X., et Winkelmann, G. (1991) Transport and utilization of ferrioxamine-E-bound iron in *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*). *Biol Met* **4**: 181-185.
- McCord, J.M., et Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin. *J Biol Chem* **244**: 6049-6055.
- McLeod, R., Buschman, E., et Arbuckle, L.D. (1995) Immunogenetics in the analysis of resistance to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* **7**: 539-552.
- Metzler, D.E. (1974) In *The chemical reactions of living cells*. Academic Press, NY.
- Mietzner, T.A., et Morse, S.A. (1994) The role of iron-binding protein in the survival of pathogenic bacteria. *Annu Rev Nutr* **14**: 471-493.

- Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics. In *A laboratory manual and handbook for E. coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mita, R.S. et Berntein, I.A., (1978) Single-strand breakage in DNA of *Escherichia coli* exposed to Cd²⁺. *J Bacteriol* **133**: 75-80.
- Moody, C.S., et Hassan, H.M. (1984) Anaerobic biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli* *J Biol Chem* **259**: 12821-12825.
- Morissette, C., Skamene, E., et Gervais, F. (1995) Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* **63**: 1718-1724.
- Moutafchiev, D., Sirakov, L., et Bontchev, P. (1998) The competition between transferrins labeled with ⁵⁹Fe, ⁶⁵Zn, and ⁵⁴Mn for the binding sites on lactating mouse mammary gland cells. *Biol Trace Elem Res* **61**: 181-191.
- Moyo, V.M., Gangaidzo, I.T., Gordeuk, V.R., Kiire, C.F., et Macphail, A.P. (1997) Tuberculosis and iron overload in Africa: a review. *Cent Afr J Med* **43**: 334-339.
- Muller-Eberhard, U., et Nikkila, H., (1989) transport of tetrapyrroles. *Semin. Hematol* **26**: 86-104.
- Nau, C.D., et Konisky, J. (1989) Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport protein: nucleotide and amino acid sequence of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J Bacteriol* **171**: 1041-1047.
- Niederhoffer, E., Naranjo, C.M., Bradley, K.L., et Fee, J.A. (1990) Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J Bacteriol* **172**: 1930-1938.

- Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., et Smith, D.F. (1974) Culture medium for *enterobacteria*. *J Bacteriol* **119**: 736-747.
- Neilands, J.B.(1981) Microbial iron compounds. *Annu Rev Biochem* **50**: 715-731.
- Neilands, J.B.(1990) Ferric uptake regulator (Fur) repressor: facts and fantasies. In S Silver, A.M. Chakrabarty, B. Iglewski, B., et Kaplan, S. (ed.), *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis, and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology Washington, D.C. pp. 382-395.
- Neilands, J.B.(1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem* **270**: 26723-26726.
- Nelson, N. (1999) Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* **18**: 4361-4371.
- Nikaïdo, H.(1996) in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (F.C. Neidhardt, ed.), ASM Press, Washington, D.C., pp 29-47.
- Novak, R., Braun, J.S., Charpentier, E., et Tuomanen, E. (1998) Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa. *Mol Microbiol* **29**: 1285-1296.
- Nunez, M.T., Gaete, V., Watkins, J.A., et Glass, J. (1990) Mobilization of iron from endocytic vesicles. The effects of acidification and reduction. *J Biol Chem* **265**: 6688-6692.
- Nyström, T. (1996) The trials and tribulations of growth arrest. *Trends Microbiol* **21**: 283-290.
- Olivier, M., et Tanner, C.E.,(1987) Susceptibilities of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **55**: 467-471.

- Orgad, S., Nelson, H., Segal, D., et Nelson, N. (1998) Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J Exp Biol* **201**: 115-120.
- Payne, S.M. (1988) Iron and virulence in *Shigella*. *Mol Microbiol* **3**: 1301-1306.
- Pecoraro, V.L. (1992) Manganese Redox Enzymes. VCH Publishers Inc., New York.
- Pettersson, A., Poolman, J.T., Van der Ley, P., et Tommassen, J. (1997) Response of *Neisseria meningitidis* to iron limitation. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 129-136.
- Pinner, E., Gruenheid, S., Raymond, M., et Gros, P. (1997) Functional complementation of the yeast divalent cation transporter family SMF by NRAMP2, a member of the mammalian natural resistance-associated macrophage protein family. *J Biol Chem* **272**: 28933-28938.
- Plant, J., et Glynn, A.A. (1976) Genetics of resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Infect Dis* **133**: 72-78.
- Posey, J.E., Hardham, J.M., Norris, S.J., et Gherardini, F.C. (1999) Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **96**: 10887-10892.
- Postle, K., et Skare, J.T. (1988) *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *J Biol Chem* **263**: 11000-11007.
- Postle, K. (1993) TonB protein and energy transduction between membranes. *J Bioenerg Biomemb* **25**: 591-601.

- Poulet, S., et Cole, S.T. (1995) Characterization of the polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Microbiol* **163**: 87-95.
- Que, Q., et Helmann, J.D.(2000) Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor (DtxR) family of proteins. *Mol Microbiol* **35**: 1454-1468.
- Prince, R.W., Cox, C.D., et Vasil, M.L. (1993) Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene. *J Bacteriol* **175**: 2589-2598.
- Privalle, C.T., et Fridovich, I. (1990) Anaerobic biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 21966-21970.
- Privalle, C.T., et Fridovich, I. (1992) Transcriptional and maturational effects of manganese and iron on the biosynthesis of maturation effects of manganese and iron on the biosynthesis of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**: 9140-9145.
- Rahme, L.G., Tan, M.-W., Le, L., Wong, S.M., Tompkins, R.G., Calderwood, S.B., et Ausubel, F.M. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13245-13250.
- Rodrigues, V., Cheah, P.Y., Ray, K., et Chia, W. (1995) *malvolio*, the *Drosophila* homologue of mouse *Nramp-1* (*Bcg*), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behaviour. *EMBO J* **14**: 3007-3020.
- Roof, S.K., Allard, J.D., Bertrand, K.P., et Postle, K. (1991) Analysis of *Escherichia coli* TonB membrane topology by use of Pho fusions. *J Bacteriol* **173**: 5554-5557.

- Rukgauer, M., Klein, J., et Kruse-Jarres, J.D. (1997) Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium, and zinc in the serum/plasma of children, adolescents, and adults. *J Trace Elem Med Biol* **11**: 92-98.
- Russell, E.S., Nash, D.J., Berntein, S.E., Kent, E.L., McFarland, E.C., Matthews, S.M., et Norwood, M.S. (1970) Characterization and genetic studies of microcytic anemia in house mouse. *Blood* **35**: 838-845.
- Saier, M.H. (1998) Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv Microb Physiol* **40**: 81-136.
- Saito, I.M., Wermald, M.R., et Williams, J.P. (1991) Some structural features of the iron-uptake regulation protein. *Eur J Biochem* **197**: 29-38.
- Sarkar, H.K., Thorens, B., Lodish, H.F., et Kaback, H.R. (1988) Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5463-5467.
- Savigni, D.L., et Morgan, E.H. (1998) Transport mechanisms for iron and other transition metals in rat and rabbit erythroid cells. *J Physiol (Lond)* **508**: 837-850.
- Schöffler, H., et Braun, V. (1989) Transport across the outer membrane of *Escherichia coli* K12 via the FhuA receptor is regulated by the TonB protein of the cytoplasmic membrane. *Mol Gen Genet* **217**: 378-383.
- Skamene, B., Gros, P., Forget, A., et al . (1982) Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**: 506-509.
- Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Patel, P.J., et Nesbitt, M.N. (1984) Regulation of resistance to leprosy by chromosome 1 locus in mouse. *Immunogenetics* **19**: 117-124.

- Skare, J.T., Roof, S.K., et Postle, K. (1989) A mutation in the amino terminus of a hybrid TrpC-TonB protein relieves overproduction lethality and result in cytoplasmic accumulation. *J Bacteriol* **171**: 4442-4447.
- Skare, J.T., Ahmer, B.M., Seachord, C.L., Darveau, R.P., et Postle, K. (1993) Energy transduction between membrane. TonB, a cytoplasmic membrane protein, can be chemically cross-linked in vivo to the outer membrane receptor FepA. *J Biol Chem* **268**: 16302-16308
- Silver, S., et Jasper, P. (1977) Manganese transport in micro-organisms. In *Microorganism and minerals*. E. D. Weinberg (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp.105-149
- Silver, S., Johnseine, P., et King, K. (1970) Manganese active transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **104**: 1299-1206.
- Silver, S. (1978) Transport of cations and anions,. In: Bacterial transport. B. P Rosen, (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 221-324.
- Silver, S., et Walderhaug, M. (1992) Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol Rev* **56**: 195-228.
- Silver, S. (1996) Transport of inorganic cations. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular biology*. Ed F. Neidhardt. ASM Press.
- Stach, J.L., Gros, P., Forget, A., et Skamene, E. (1984) Phenotypic expression of genetically-controlled natural resistance to Mycobacterium bovis (BCG). *J Immunol* **132**: 888-892.
- Stach, W.W. (1992) Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? *Ann Int Med* **116**: 937-941.
- Stadtman, E.R., Berlett, B.S., et Chock, P.B. (1990) Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 384-388.

- Stead, W.W. (1992) Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? *Ann Intern Med* **116**: 937-41.
- Steinman, H.M., et Ely, B. (1990) Copper-zinc superoxide dismutase of *Caulobacter crescentus*: cloning, sequencing, and mapping of the gene and periplasmic location of the enzyme. *J Bacteriol* **172**: 2901-2910.
- Stojiljkovic, I., Cobeljic, M., et Hantke, K. (1993) *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett* **108**: 111-115.
- Stojiljkovic, I., et Srinivasan, N., (1997) *Neisseria meningitidis tonB, exbB, exbD* genes: TonB-dependant utilization of protein-bound iron in *Neisseriae*. *J Bacteriol* **179**: 805-812.
- Su, M.A., Trenor, C.C., Fleming, J.C., Fleming, M.D., et Andrews, N.C. (1998) The G185R mutation disrupts function of the iron transporter Nramp2. *Blood* **92**: 2157-2163.
- Supek, F., Supekova, L., Nelson, H., et Nelson, N. (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5105-5110.
- Tigyi, Z., Kishore, A.R., Maeland, J.A., Forsgren, A., et Naidu, A.S. (1992) Lactoferrin-binding proteins in *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **60**: 2619-2626.
- Tomii, K., et Kanehisa, M. (1998) A comparative analysis of ABC transports in complete microbial genomes. *Genome Res* **8**: 1048-1059.

- Tsolis, R.M., Bäumlner, A.J., Heffron, F., et Stojiljkovic, I. (1996) Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun* **64**: 4549-4556.
- Uchiya, K., Barbieri, M.A., Funato, K., Shah, A.H., Stahl, P.D., et Groisman, E.A. (1999) A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* **18**: 3924-3933.
- van Hove, B., Staudenmaier, H., et Braun, V. (1990) Novel two-component transmembrane transcription control: regulation of iron dicitrate transport in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**: 6749-6758.
- van Weert, A.W., Dunn, K.W., Gueze, H.J., Maxfield, F.R., et Stoorvogel, W. (1995) Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol* **130**: 821-834.
- Vartivarian, S.E., et Cowart, R.E. (1999) Extracellular iron reductases: identification of a new class of enzymes by siderophore-producing microorganisms. *Arch Biochem Biophys* **364**: 75-82.
- Vidal, S.M., Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., et Gros, P. (1993) Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* **73**: 469-485.
- Vidal, S., Belouchi, A., Cellier, M., Beatty, B., et Gros, P. (1995) Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. *Mamm Genome* **6**: 224-230.
- Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A., et Neilands, J.B. (1981) ColV plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **33**: 540-545.

- Watnick, P.L., Eto, T., Takakachi, H., et Calderwood, S.D. (1997) Purification of *Vibrio cholera* Fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol* **179**: 243-247.
- Wedler, F.C. (1993) Biological significance of manganese in mammalian systems. *Prog Med Chem* **30**: 89-133.
- Weinberg, E.D. (1984) Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.* **64**: 65-102.
- Weinberg, E.D. (1995) in *Mechanisms of Bacterial Virulence*, 2nd ed. (Roth, J.A., Bolin, C.A., Brogden, K.A., Minion, F.C., and Wannemuehler, eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp 79-93.
- Weiss, A.A., Silver, S., et Kinscherf, T.G. (1978) Cation transport alteration associated with plasmid-determined resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **14**: 856-865.
- West, A.H., Clark, D.J., Neupert, W., Hartl, F.-U. et Horwich, A.I. (1992) Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. *J Biol Chem* **267**: 24625-24633.
- Williams, P.H.(1979) Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component of the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect immun* **26**: 925-932.
- Wooldridge, K.G., et Williams, P.H. (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**: 325-348.

Yim, M.B., Berlett, B.S., Chock, P.B., et Stadtman, E. R. (1990) Manganese(II)-bicarbonate-mediated catalytic activity for hydrogen peroxide dismutation and amino acid oxidation: detection of free radical intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 394-398.

Yocum, C.F., et Pecoraro, V. (1999) Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 182-187.

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

Annexe

Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter

Hortence Makul,¹ Eva Roig,¹ Stewart T. Cole,²
John D. Helmann,³ Philippe Gros⁴ and
Mathieu F. M. Cellier^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Bd des prairies,
Laval H7V 1B7, PQ, Canada.

²Unité de Génétique Moléculaire Bactérienne, Institut
Pasteur, 25–28 rue du docteur Roux 75724 Paris Cedex
15, France.

³Section of Microbiology, Wing Hall, Cornell University,
Ithaca, NY 14853-8101, USA.

⁴Department of Biochemistry, McGill University, 3655
Drummond, Montréal H3G 1Y6, PQ, Canada.

Summary

The *Escherichia coli* *mntH* (formerly *yfeP*) gene encodes a putative membrane protein (MntH) highly similar to members of the eukaryotic Nramp family of divalent metal ion transporters. To determine the function of *E. coli* MntH, a null mutant was created and MntH was overexpressed both in wild-type *E. coli* and in the metal-dependent mutant *hflB1(Ts)*. At the restrictive temperature 42°C, the *mntH* null mutation reduces the suppression of *hflB1(Ts)* thermosensitivity by exogenous divalent metals. Conversely, overexpression of MntH restores growth at 42°C, increases suppression of the *ts* phenotype by Fe(II) and Ni(II) and renders *hflB1(Ts)* cells hypersensitive to Mn(II). Transport studies in intact cells show that MntH selectively facilitates uptake of ⁵⁴Mn(II) and ⁵⁵Fe(II) in a temperature-, time- and proton-dependent manner. Competition studies in uptake assays and growth inhibition experiments in *hflB1(Ts)* mutants together indicate that MntH is a divalent metal cation transporter of broad substrate specificity. The functional characteristics of MntH suggest that it corresponds to the previously described manganese transporter of *E. coli*. This study indicates that proton-dependent divalent metal ion uptake has been preserved in the Nramp family from bacteria to humans.

Introduction

Bacteria have developed sophisticated acquisition systems to scavenge and recruit essential metals from the environment. These include constitutively expressed or inducible low- and high-affinity transport systems for chelated or free metals (Guerinot, 1994). Iron acquisition is crucial for microbes during infection, in particular for intracellular parasites that reside inside macrophages, because hosts and pathogens compete for the same intracellular divalent cations pools (Jurado, 1997; Nelson, 1999). Macrophages use metal ions for the synthesis of toxic oxygen radicals (oxidative burst) and as cofactors for detoxification systems for self-protection. Likewise, iron is a nutrient essential for intracellular microbial growth and, together with manganese, is an important cofactor for enzymatic antioxidant defences of the pathogen, e.g. catalase, peroxidase and superoxide dismutase (Christianson, 1997; Byers and Arceneaux, 1998).

Several inducible receptor systems for chelators of Fe(III), such as siderophores, haem and siderophilins, are important for the growth of pathogens. In *Enterobacteriaceae*, these systems are composed of an outer-membrane receptor, or regulated channel, that requires energy (TonB-dependent) to mediate uptake of chelated Fe(III) into the periplasm. In addition, an ATP-dependent periplasmic uptake system is required for subsequent import of cytoplasmic Fe(III) (for a review, see Braun *et al.*, 1998). In contrast, soluble Fe(II) freely diffuses into the periplasmic space and can be imported in the cytoplasm by either the major ATP-dependent high-affinity FeoABC system ($K_m \approx 1 \mu\text{M}$; Braun *et al.*, 1998) or, in low Mg(II) conditions, by the proton-dependent CorA–D system (Gibson *et al.*, 1991; Hantke, 1997). Fe(II) uptake systems play an important role in microbial pathogenesis, including invasion, intracellular survival and multiplication. *Enterobacteriaceae* *feoB* mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine (Stojiljkovic *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996). In addition, secreted iron reductases [Fe(III) → Fe(II)] are constitutively expressed even in siderophore-producing bacteria (Vartivarian and Cowart, 1999), and mutants in the Fe(III) (*entB*, *tonB*) or Fe(II) (*feoB*) acquisition systems show upregulation of extracellular iron reductase activities (Vartivarian *et al.*, 1999). It appears thus important to characterize additional Fe(II) uptake systems expressed by *Enterobacteriaceae*.

Received 2 September, 1999; revised 14 November, 1999; accepted
19 November, 1999. For correspondence. E-mail mathieu.cellier@iaf.
uquebec.ca; Tel. (+1) 450 687 5010 ext. 4681; Fax (+1) 450 686 5501.