

## **Le gène NRAMP1 : résistance aux infections intracellulaires et activité antimicrobienne des phagocytes**

**Mathieu Cellier  
Philippe Gros**

Le gène *NRAMP1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*) code pour une protéine intégrale des cellules phagocytaires professionnelles, macrophages et granulocytes, localisée dans la membrane de leurs phagosomes. Il participe à la résistance naturelle aux infections : en son absence, ou lorsqu'il est muté, la croissance des parasites intracellulaires, *Mycobacterium tuberculosis*, *leishmania*, salmonelles... n'est plus contrôlée. Ce gène appartient à une famille conservée dans l'évolution et ses analogues ont été mis en évidence dans les plantes, les champignons, les bactéries, les levures et les vertébrés. L'analyse des séquences déduites prédit un modèle topologique compatible avec un rôle de transporteur ou d'échangeur ionique. Son représentant chez la levure, *Smf1*, a été impliqué dans le transport du  $Mn^{2+}$ . Son rôle chez les vertébrés est-il d'évacuer du phagosome ce cation indispensable à la multiplication des pathogènes ? Il aurait alors un compétiteur de la même famille dans la paroi des parasites !

### ADRESSES

M. Cellier : *professeur titulaire*. Institut Armand-Frappier, centre de recherche en immunologie, CP100, 531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7N-4Z3 Canada.  
E-mail : Gros@medcor.mcgill.ca  
P. Gros : *professeur titulaire*. Département de biochimie et centre de l'étude de la résistance de l'Hôte, Université McGill, Montréal, Québec, H3G-1Y6 Canada.  
E-mail : Mathieu-Cellier@iaf.quebec.ca.

**A**u cours de la dernière décennie, les maladies infectieuses d'origine bactérienne et parasitaire sont redevenues un problème de santé publique inquiétant [1]. Après environ un demi-siècle de confort relatif, procuré par l'amélioration globale des conditions d'hygiène et l'utilisation d'antibiotiques pour traiter ces infections, l'émergence alarmante de nouvelles souches de micro-organismes résistantes à un ou

plusieurs types d'antibiotiques, ou ayant acquis une virulence accrue, a contribué au retour en force de fléaux presque oubliés. Ces phénomènes sont maintenant observés pour la plupart des agents infectieux pour l'homme, mais les exemples les plus préoccupants concernent le bacille tuberculeux (*Mycobacterium tuberculosis*) avec près du tiers des nouveaux isolats résistants à au moins un antibiotique (isoniaside, rifampicine) [2], le parasite du paludisme

## RÉFÉRENCES

1. Young P. White house to expand response to infectious diseases. *ASM News* 1996; 62: 1450-1.
2. Young DB, Duncan K. Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 641-73.
3. Foote SJ, Cowman AF. The mode of action and mechanism of resistance to anti-malarial drugs. *Acta Tropica* 1994; 56: 157-71.
4. Berkelman RL, Bryan RT, Osterholm MT, Le Duc JW, and Hughes JM. Infectious disease surveillance: a crumbling foundation. *Science* 1994; 264: 368-70.
5. Garcia del Portillo F, Finlay BB. The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. *Trends Microbiol* 1995; 3: 373-80.
6. O'Brien SJ. Ghetto legacy. *Curr Biol* 1991; 1: 209-11.
7. Gros P, Skamene E, Forget A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol* 1981; 127: 2417-26.
8. Skamene E, Gros P, Forget A, Kongshavn PAL, St-Charles C, Taylor BA. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* 1982; 297: 506-9.
9. Gros P, Skamene E, Forget A. Cellular mechanism of genetically controlled host resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Immunol* 1983; 31: 1966-72.
10. Stach J L, Gros P, Forget A, Skamene E. Phenotypic expression of genetically controlled natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Immunol* 1984; 132: 888-92.
11. Stokes RW, Orme I, Collins FM. Role of mononuclear phagocytes in expression of resistance and susceptibility to *Mycobacterium avium* infections in mice. *Infect Immun* 1986; 54: 811-9.
12. Denis M, Forget A, Pelletier M, Gervais F, Skamene E. Killing of *Mycobacterium smegmatis* by macrophages from genetically susceptible and resistant mice. *J Leuk Biol* 1990; 47: 25-30.
13. Lissner CR, Swanson RN, O'Brien AD. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella typhimurium*. Expression of the *Ity* gene in peritoneal and splenic macrophages isolated *in vitro*. *J Immunol* 1983; 131: 3006-13.
14. Crocker PR, Blackwell JM, Bradley, DJ. Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infect Immun* 1984; 43: 1033-40.
15. Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, and Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for *Bcg*. *Cell* 1993; 73: 469-86.

(*Plasmodium falciparum*) chez lequel la résistance à la chloroquine, la mefloquine et d'autres molécules de type 4-amino quinoline est généralisée dans les zones endémiques [3] et, finalement, certaines variétés de staphylocoques, streptocoques et pneumocoques rencontrées en milieu hospitalier contre lesquels seuls restent disponibles un ou deux antibiotiques [4]. Parallèlement, les capacités de l'industrie pharmaceutique de découvrir, par les méthodes classiques, de nouvelles molécules actives permettant de contourner ces problèmes de résistance, s'essoufflent rapidement. Cependant, des stratégies alternatives propices au développement rapide de nouveaux types d'antibiotiques se profilent à l'horizon des projets de séquençage des génomes d'agents pathogènes. L'analyse des séquences devrait permettre l'identification de protéines microbiennes d'importance vitale et la conception de molécules destinées à inhiber spécifiquement la croissance des agents pathogènes.

Une approche différente mais complémentaire est fondée sur une meilleure connaissance des mécanismes naturels de défense de l'hôte contre les infections, en particulier ceux exprimés par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial. Les « phagocytes professionnels » incluent les granulocytes circulants du sang périphérique et les macrophages résidant dans les tissus sont impliqués dans les interactions initiales entre les pathogènes et leur hôte. Ces cellules disposent d'un arsenal d'armes bactéricides et bactériostatiques destinées à éliminer, ou du moins rapidement contrôler, la multiplication de la grande majorité des agents infectieux. Cependant, bactéries et parasites ont eux-mêmes développé des mécanismes d'évasion qui leur permettent, dans certains cas, de survivre aux attaques de ces cellules, soit en inhibant la phagocytose, soit en survivant à l'intérieur des phagocytes comme les pathogènes intracellulaires responsables de maladies telles que la tuberculose, la salmonellose, la brucellose et autres [5]. La caractérisation biochimique des phagocytes du système réticulo-endothélial a été l'approche la plus fructueuse pour révéler certains des mécanismes antimicrobiens de ces

cellules et elle a bénéficié de l'observation de désordres congénitaux associés à de sévères déficits immunitaires. Plus généralement, l'influence de facteurs génétiques sur la susceptibilité envers différents types d'infections est bien établie sur la base d'études de populations humaines ou de pedigrees familiaux, dans les zones endémiques ou bien lors d'épidémies [6]. L'identification du ou des gènes impliqués, peut conduire à découvrir de nouveaux mécanismes antimicrobiens de l'hôte. Cependant, le caractère souvent polygénique du phénotype de prédisposition rend difficile l'identification systématique des gènes impliqués. La souris peut alors fournir un modèle expérimental idéal pour disséquer les mécanismes d'un contrôle génétique complexe et étudier séparément les gènes responsables. En effet, la disponibilité de lignées pures de souris, la production de nombreux marqueurs moléculaires facilitant les analyses génétiques classiques, et la possibilité d'introduire des mutations ciblées dans les cellules somatiques permettent une analyse directe et rapide de ces facteurs génétiques.

## Le locus *Bcg*, *Ity*, *Lsh*

L'infection de lignées pures de souris par des agents pathogènes à développement intracellulaire tels que *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Leishmania* ou *Brucella*, produit deux types de réponses dans les tissus réticulo-endothéliaux durant la phase précoce de l'infection. La prolifération microbienne est importante chez les animaux sensibles alors qu'on ne décèle aucune multiplication chez les animaux résistants. Dans le cas d'agents infectieux peu virulents chez la souris comme *Mycobacterium bovis* BCG ou *Leishmania donovani*, la réponse immunitaire spécifique, sous le contrôle des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité, permet de mettre fin à l'infection chez les souris sensibles. Dans le cas d'agents pathogènes virulents, comme *Salmonella typhimurium*, les animaux sensibles succombent rapidement à une infection fulgurante. Des analyses de ségrégation ont démontré que le contrôle génétique observé durant la phase précoce est exercé par un locus unique connu sous les noms de

*Bcg*, *Ity*, et *Lsh*. Le gène est situé sur le chromosome 1 murin et existe sous deux formes alléliques dans les lignées pures de souris; l'allèle résistant (*Bcg<sup>r</sup>*) est dominant et l'allèle sensible, récessif (*Bcg<sup>s</sup>*) [7, 8]. Des analyses détaillées du type cellulaire impliqué dans ce contrôle génétique ont montré que *Bcg* n'affecte pas le système immunitaire, mais bien le système réticulo-endothélial [9]. Des tests de bactéricidie *in vitro* à partir de populations de cellules isolées ont indiqué que le macrophage tissulaire est responsable de l'expression du gène *Bcg*, les macrophages résistants montrant une capacité supérieure de contrôler la répllication intracellulaire des micro-organismes impliqués [10-14]. Il semble que *Bcg* module l'activité bactériostatique (plutôt que bactéricide) de ces cellules. Bien que le mécanisme d'action demeure inconnu, le fait que *Bcg* affecte le taux de multiplication intracellulaire d'agents infectieux phylogéniquement très éloignés et sans caractère antigénique commun, suggère un rôle fondamental dans l'activité antimicrobienne des macrophages. Un effort considérable a donc été entrepris pour identifier la base moléculaire de cette activité. En l'absence d'anticorps spécifiques contre la protéine, ou de tests biochimiques directs pour étudier son mode d'action, ces efforts se sont avérés vains.

### Clonage du gène *Nramp1* (*Bcg*)

Le gène *Bcg* a été isolé par clonage positionnel [15]. Cette stratégie est fondée uniquement sur la connaissance de la localisation chromosomique du gène et comporte les étapes suivantes. Premièrement, une cartographie ultra-fine de la région chromosomique est effectuée pour délimiter l'intervalle génétique maximum (en centi-Morgan, cM) contenant le gène. Cette étape est réalisée en utilisant un grand nombre de souris issues de croisements au cours desquels le gène ségrège, et un nombre aussi grand que possible de marqueurs polymorphes pour le génotypage des souris. Un intervalle de 0,3 cM a pu être ainsi délimité [16]. Deuxièmement, la distance génétique (cM) est transformée en

intervalle physique (en kilobases, kb), en cartographiant de grand fragments chromosomiques séparés par électrophorèse en champ pulsé et caractérisés par hybridation (*Southern blot*). A l'aide de cette méthode, la région du gène *Bcg* a été restreinte à un segment chromosomique de 1 200 kb [17]. Troisièmement, le segment d'ADN est cloné sous forme d'une banque de chromosomes recombinants de levures (YAC), contenant chacun de 250 kb à 800 kb d'ADN génomique de souris, qui sont ordonnés par recherche de chevauchement. Enfin la recherche d'unités transcriptionnelles correspondant aux gènes candidats est engagée. La

méthode d'amplification d'exons directement à partir du *contig* d'ADN cloné a permis d'identifier un grand nombre d'exons, qui ont été ensuite regroupés en six gènes candidats pour *Bcg*, soit par l'analyse du profil d'expression tissulaire des ARNm correspondants, soit directement par criblage de banques d'ADN complémentaires (ADNc) [15]. Un des six gènes codait pour la protéine intestinale Villine, deux étaient exprimés dans tous les tissus analysés, tandis que les ARNm correspondant à deux autres gènes n'ont pu être détectés dans aucun des tissus analysés. Un des gènes était exprimé uniquement dans les organes réticulo-endothéliaux et

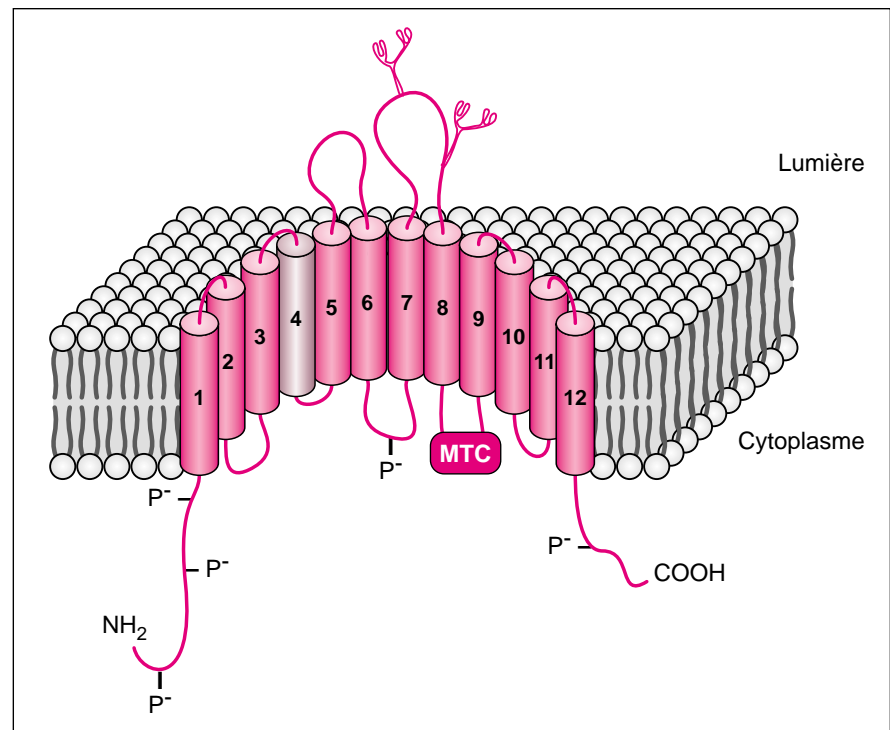


Figure 1. **Prédiction structurale et de topologie transmembranaire de *Nramp1*.** Douze segments transmembranaires présumptifs sont représentés par des cylindres; le segment 4 (bistre) contient la mutation associée au phénotype de susceptibilité aux infections (*Bcg<sup>s</sup>*). Les sites possibles des modifications post-traductionnelles de la protéine *Nramp1* détectées dans les macrophages murins, phosphorylation et glycosylation, sont représentés respectivement dans les boucles intra- et extracytoplasmiques. Le cœur hydrophobe, conservé entre les séquences appartenant à la famille *Nramp*, comprend les segments transmembranaires 1-10 (385 acides aminés en moyenne). La topologie consensus prédite pour l'ensemble des séquences favorise l'hypothèse d'un arrangement des hélices en faisceau et place la boucle entre les segments transmembranaires 8-9, qui contient un motif analogue à une région de perméation transmembranaire (MTC, motif de transport conservé), sur la face intracytoplasmique de la membrane (cytoplasme). La face luminale de la membrane (lumière) correspond à l'espace extracytoplasmique (ex.: extracellulaire, intraphagosomal).

## RÉFÉRENCES

16. Malo D, Vidal S, Skamene E, and Gros P. High resolution linkage map in the vicinity of the host resistance locus *Bcg* on mouse chromosome 1. *Genomics* 1993; 16: 655-63.
17. Malo D, Vidal S, Lieman J, Ward D C, and Gros P. Physical delineation of the minimal chromosomal segment encompassing the host resistance locus *Bcg*. *Genomics* 1993; 17: 667-75.
18. Kerppola RE, Ames GFL. Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. Comparison with other members of the family. *J Biol Chem* 1992; 267: 2329-36.
19. Malo D, Vogan K, Vidal S, Hu J, Cellier M, Schurr E, Fuks A, Morgan K, Gros P. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics* 1994; 23: 51-61.
20. Vidal S, Tremblay M, Govoni G, Sebastiani G, Malo D, Olivier M, Skamene E, Jothy S, Gros P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp 1* gene. *J Exp Med* 1995; 182: 655-66.
21. Cellier M, Govoni G, Vidal S, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Gros P. The human *NRAMP* gene: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization and tissue specific expression. *J Exp Med* 1994; 180: 1741-52.
22. Liu J, Fujiwara MT, Buu NT, Sanchez F, Cellier M, Paradis A, Frappier D, Gros P, Skamene E, Morgan K, and Schurr E Identification of Polymorphisms and sequence variants in the human natural resistance-associated macrophage protein (*NRAMP*) gene, a candidate gene for susceptibility to tuberculosis. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 845-53.
23. Buu NT, Cellier M, Gros P, E Schurr. Identification of a highly polymorphic length variant in the 3' UTR of *NRAMP1*. *Immunogenetics* 1995; 42: 428-9.
24. Cellier M, Shustik C, Dalton W, Rch E, Hu J, Malo D, Schurr E, Gros P. The human *NRAMP1* gene as a marker of professional primary phagocytes: Studies in blood cells and in induced HL-60 promyelocytic leukemia. *J Leuk Biol* 1997 (sous presse).
25. Gruenheid S, Cellier M, Vidal S, Gros P. Identification and characterization of a second mouse *Nramp* gene. *Genomics* 1995; 25: 514-25.
26. Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, Gros P. *Nramp* defines a new family of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10089-193.
27. Cellier M, Belouchi A, Gros P. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of *Nramp*. *Trends Genet* 1996; 12: 201-4.
- les macrophages dérivés de ces organes et représentait le candidat le plus intéressant pour *Bcg*. Un ADNc complet a été isolé et le gène correspondant dénommé *Nramp1* (*natural resistance associated macrophage protein 1*) [15]. Le séquençage de ce clone a permis d'identifier une protéine très hydrophobe de 60 kDa ayant des caractéristiques d'une protéine membranaire, incluant la présence de douze segments transmembranaires, une boucle extracellulaire pouvant être glycosylée, ainsi que de nombreux sites possibles de phosphorylation (figure 1). Une des caractéristiques intéressantes de la protéine est la présence inhabituelle de plusieurs acides aminés chargés dans les domaines transmembranaires. A l'époque de sa découverte, aucune séquence polypeptidique présente dans les banques de données ne montrait de similitude notable avec la protéine *Nramp1*. Cependant, la détection d'un motif de séquence préalablement décrit dans une série de transporteurs membranaires procaryotes et eucaryotes suggérait un rôle possible de la protéine *Nramp1* dans les échanges membranaires des macrophages [18]. Le séquençage du gène *Nramp1* dans les lignées pures de souris a montré la stricte association de la susceptibilité aux infections (*Bcg*<sup>s</sup>) avec le remplacement d'une glycine à la position 169 par un acide aspartique (G169D) dans le quatrième domaine transmembranaire de la protéine ([19], figure 1). Le remplacement à l'intérieur d'un domaine membranaire d'un acide aminé à caractère neutre par un résidu beaucoup plus volumineux possédant une charge négative, suggère un effet néfaste possible sur l'insertion dans la membrane ou la stabilité de la protéine. Pour démontrer l'identité des gènes *Nramp1* et *Bcg*, une lignée de souris mutantes dépourvues du gène *Nramp1* a été créée par recombinaison homologue [20]. Ces souris *Nramp1*<sup>-/-</sup>, bien que d'apparence et de longévité normales, perdent leur résistance naturelle aux infections par *Mycobacterium*, *Salmonella*, et *Leishmania*, indiquant que *Nramp1* et *Bcg* sont effectivement un seul même gène [20]. Le gène analogue *NRAMP1* humain a été cloné, et plusieurs mar-
- queurs polymorphes ont été identifiés dans le gène [21-23]. Ces marqueurs ont été mis à la disposition de plusieurs laboratoires pour déterminer si le gène humain est associé à la prédisposition à certaines maladies infectieuses telles que la tuberculose, la lèpre et la leishmaniose. Chez l'homme, les granulocytes circulants expriment le gène *NRAMP1* à très haut niveau, bien supérieur au niveau détecté dans les monocytes sanguins et supérieur également au taux d'expression détecté dans les macrophages alvéolaires du poumon [24]. L'expression du gène *NRAMP1* n'est donc pas restreinte spécifiquement aux macrophages et on peut concevoir que la protéine *NRAMP1* contribue à un mécanisme antimicrobien commun aux cellules phagocytaires.

### ***Nramp1*, prototype d'une famille ancestrale de protéines membranaires**

Le gène *Nramp1* appartient à un petit groupe de gènes apparentés. Chez les mammifères, un deuxième gène a été isolé et dénommé *Nramp2* [25]. Le gène *Nramp2* code pour une protéine dont la séquence est très conservée avec *Nramp1* (78 % d'identité) mais se distingue de son homologue par une localisation chromosomique différente et un profil d'expression tissulaire quasi ubiquitaire, bien que l'ARNm n'ait pas été détecté dans les cellules phagocytaires [24]. Il apparaît donc possible que les gènes *Nramp1/Nramp2* soient le résultat d'une évolution par duplication génique visant à exprimer des fonctions similaires (de transport ou de transmission membranaire du signal) dans des contextes cellulaires différents. *Nramp2* remplirait une fonction importante pour la physiologie cellulaire en général, alors que *Nramp1* pourrait refléter son adaptation à un aspect particulier de la physiologie des cellules phagocytaires. D'autre part, le développement des programmes de séquençage génomique à grande échelle a permis d'identifier, par criblage des banques de données, de nombreuses séquences similaires provenant d'espèces phylétiquement très éloignées (mammifères, invertébrés, plantes, levures et bacté-



ries). L'analyse comparative des séquences a permis d'établir leur homologie et de définir une organisation transmembranaire conservée au cours de l'évolution [26, 27]. La famille de protéines ainsi définie est caractérisée par la présence d'un cœur hydrophobe, composé de dix segments transmembranaires, dont le profil d'hydrophobicité et la séquence sont très conservés (figure 1).

La famille de gènes apparentés à *Nramp1* inclut un homologue identifié chez la mouche *D. melanogaster*, dénommé *Malvolio*, qui est exprimé dans les phagocytes ainsi que dans le système nerveux central et périphérique. L'altération de son expression lors de mutations induites expérimentalement conduit à des désordres du comportement gustatif [28]. La séquence du cœur hydrophobe de la protéine Mvl présente un degré d'identité de l'ordre de 70 % avec *Nramp1/2*. Deux gènes organisés en tandem et partageant une organisation similaire des exons/introns, ont été identifiés chez le nématode *C. elegans*; les polypeptides correspondants montrent 85 % d'identité entre eux et environ 67 % d'identité avec les protéines de mammifères. Trois analogues ont été récemment isolés chez la plante *O. sativa* (*OsNramp1*, -2, -3) qui diffèrent par leur spécificité d'expression, soit dans la feuille, soit dans la racine, soit dans ces deux organes [29]. Le degré d'identité entre ces séquences et leurs analogues des mammifères varie entre 50 % et 60 %. Chez la levure *S. cerevisiae*, dont le génome est totalement séquencé, trois analogues ont également été identifiés; leurs séquences présentent entre elles environ 65 % d'identité et 40 %-45 % d'identité avec les séquences de mammifères. Deux de ces gènes (*Smf1*, -2) ont été initialement identifiés lors d'études de complémentation d'un mutant défectueux pour l'importation des protéines mitochondriales [30]; par la suite, le gène *Smf1* a été à nouveau identifié par complémentation fonctionnelle d'un mutant sensible à de fortes concentrations extracellulaires d'EGTA, un agent complexant des cations divalents [31]. Enfin, un gène analogue a été identifié chez les procaryotes, dans le génome de la mycobactérie *M. leprae*. La séquence de la protéine correspondante montre une

conservation remarquable avec les protéines de mammifères (37 % d'identité). En amplifiant par PCR, à l'aide d'oligonucléotides spécifiques, un fragment du gène authentifié par clonage et séquençage à partir d'espèces mycobactériennes, soit à croissance lente et pathogène pour l'homme (*M. tuberculosis*, *M. avium*), soit à croissance rapide et non pathogène pour l'homme (*M. smegmatis*), on a démontré récemment que la présence de cette séquence chez les mycobactéries n'est pas le résultat d'une transmission horizontale entre cellule-hôte et parasite intracellulaire mais plutôt d'origine ancienne (Cellier, Cole et Gros, non publié). Bien qu'une démonstration directe de la fonction biochimique d'une des protéines de la famille *Nramp* reste à établir, l'existence et la conservation remarquable de ces séquences de la bactérie à l'homme implique une origine très ancienne d'un prototype *Nramp*. De plus, ces données suggèrent la possibilité d'une structure commune associée au transport ou à la perméation de solutés au travers de la membrane, et de son évolution par duplication génique permettant une divergence d'expression ou de spécificité.

### Prédictions structurales et fonctionnelles

Des analyses réalisées pour chacune des séquences, utilisant le programme Memsat qui calcule, d'après les propriétés intrinsèques des séquences, leur tendance à former des hélices alpha et leur orientation possible dans la membrane, ont révélé des prédictions très similaires pour le cœur hydrophobe des séquences apparentées à *Nramp*. Les résultats concordent avec ceux obtenus avec les programmes Tmap et PredictProtein qui déterminent la position et la structure possible des segments transmembranaires à partir d'un alignement multiple, en tenant compte des substitutions observées entre les séquences alignées [27]. De ces prédictions complémentaires résulte une topologie consensuelle toute en hélices  $\alpha$  pour le cœur hydrophobe, qui inclut dix segments transmembranaires et positionne l'extrémité aminotermine de la chaîne polypeptidique dans le cyto-

plasma (figure 1). La séquence des domaines transmembranaires présomptifs est très conservée, et contient notamment des charges négatives invariantes. L'alternance des résidus conservés avec des positions plus variables (résidus neutres ou hydrophobes) contribue à la grande similitude des profils d'hydrophobicité des différentes séquences. L'analyse de la périodicité de la conservation des séquences, résidus hydrophobes contre résidus polaires ou chargés, permet d'identifier plusieurs hélices transmembranaires biphasiques. Ces hélices présomptives pourraient être constituées d'une face non chargée, de séquence variable, distincte d'une face très conservée et pouvant être chargée ou polaire. Il en résulterait pour certaines des hélices un net caractère amphiphile. La face non chargée permettrait la solubilisation dans l'environnement hydrophobe de la membrane alors que la face polaire ou chargée pourrait permettre des interactions entre les différentes hélices et/ou ménager un conduit hydrophile traversant la membrane [26]. La mutation ponctuelle G169D déterminant le phénotype *Bcg<sup>s</sup>* chez la souris conduirait, selon nos hypothèses, à l'introduction d'une charge dans la face accessible au solvant lipidique, et aurait pour effet de déstabiliser la solubilisation de la protéine au sein de la membrane. Cela pourrait expliquer l'absence de protéine mûre récemment observée dans les macrophages des souris *Bcg<sup>s</sup>* [32]. La boucle intracytoplasmique la plus conservée est localisée entre les hélices transmembranaires prédites 8 et 9. La conservation de la séquence dans cette région suggère une signification fonctionnelle, sur la base de similitudes de séquence avec des motifs identifiés dans différentes familles de canaux et transporteurs membranaires tels que les canaux potassiques et les pompes à protons de type vacuolaire. En particulier, le motif TMT(X4)G (D/Q) (X4)GF\* est précisément conservé entre les séquences *Nramp* animales et la

\* Thr-Met-Thr (4 résidus n'importe lesquels) Gly (Glu/Gln) 4 résidus Gly-Phe.

## RÉFÉRENCES

28. Rodrigues V, Cheah PY, Ray K, Chia W. Malvolio the *Drosophila* homologue of mouse NRAMP-1 (*Bcg*), is expressed in macrophages and in the nervous system and is required for normal taste behavior. *EMBO J* 1995; 14: 3007-20.

29. Belouchi A, Cellier M, Kwan T, Saini HS, Leroux G, Gros P. The macrophage specific membrane protein Nrap controlling natural resistance to infections in mice has homologs expressed in the root system of plants. *Plant Mol Biol* 1995; 29: 1181-96.

30. West AH, Clarck DJ, Martin J, Neupert W, Hartl FU, Horwich AL. Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. *J Biol Chem* 1992; 267: 24625-33.

31. Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5105-10.

32. Vidal S M, Pinner E, Lepage P, Gauthier S, Gros P. Natural resistance to intracellular infections: Nrap1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (*Nrap1D169*) mouse strains. *J Immunol* 1997 (sous presse).

33. Wood MW, Vandongen HMA, Vandongen AMJ. Structural conservation of ion conduction pathways in K<sup>+</sup> channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4882-6.

34. Desjardins M. Biogenesis of phagolysosomes: the « kiss and run » hypothesis. *Trends Cell Biol* 1995; 5: 183-6.

35. Alpuche-Aranda CM, Racoosin EL, Swanson JA, Miller SI. *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *J Exp Med* 1994; 179: 601-8.

36. Baldwin CL, Winter AJ. Macrophages and *Brucella*. *Immunol Series* 1994; 60: 363-80.

37. Sturgill-Koszycki S, Schlessinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser Jand Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton ATPase. *Science* 1994; 26: 678-81.

38. Mauel J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *J Leuk Biol* 1990; 47: 187-93.

39. Campbell PA. Macrophage-*Listeria* interactions. *Immunol Series* 1994; 60: 313-28.

40. Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H. *Legionella* and macrophages. *Immunol Series* 1994; 60: 329-48.

séquence de la région du pore transmembranaire du canal K<sup>+</sup> *Shaker* [33]. Par ailleurs, la distribution périodique des résidus glycine et autres résidus neutres de faible encombrement stérique observé dans cette région de l'alignement des séquences Nrap est très voisine de la séquence de l'hélice transmembranaire 3 dans la famille de l'ATPase vacuolaire [27]. Dans leur ensemble, ces prédictions structurales et fonctionnelles suggèrent une organisation pour les protéines de la famille Nrap selon un faisceau d'hélices transmembranaires qui pourrait faciliter le transport ou la perméation d'un substrat chargé positivement.

### Vers un mécanisme d'action de Nrap1 chez les phagocytes

La question du mécanisme d'action de la protéine Nrap reste entière et il est difficile de concevoir *a priori* un mécanisme d'action affectant sélectivement la multiplication de certains types d'agents pathogènes intracellulaires. Cependant, de récentes expériences de localisation subcellulaire de la protéine ont aidé à formuler des hypothèses [32]. Grâce à la production d'anticorps spécifiques dirigés contre la protéine Nrap1, on a pu établir que cette dernière est une protéine membranaire intégrale résistante à l'extraction par l'urée. En outre, dans le macrophage, Nrap1 est phosphorylée et fortement glycosylée, l'addition post-traductionnelle de sucres complexes contribuant pour environ 40 % de son poids moléculaire apparent [32]. Des études d'immunofluorescence en microscopie confocale ont montré que la protéine n'est présente ni au niveau de la membrane plasmique ni au niveau de la membrane nucléaire, mais est en fait localisée dans un compartiment intracellulaire qui est positif pour des marqueurs endosomiques et lysosomaux tels que Lamp-1 (Gruenheid *et al.*, en préparation). Des expériences de fractionnement cellulaire, ainsi que l'étude de la distribution de la protéine Nrap1 lors de la phagocytose dans des macrophages, ont montré que la protéine est, de façon très semblable à Lamp-1, recrutée dans la membrane phagosomique au cours de la

maturation du phagosome (figure 2). Cette observation est particulièrement intéressante car, d'une part, elle place Nrap1 à proximité des microbes dont elle peut affecter la

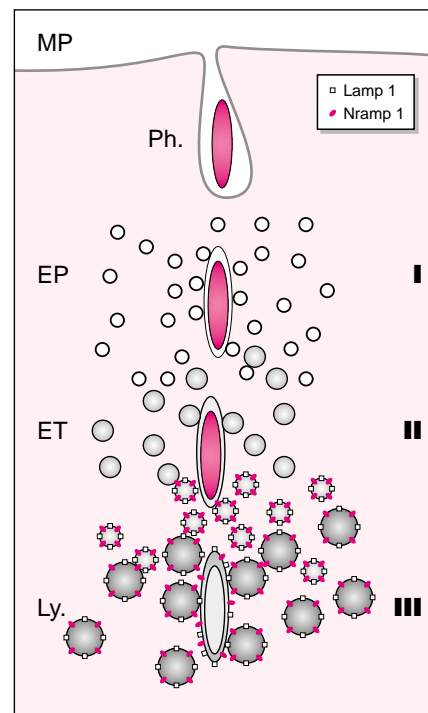
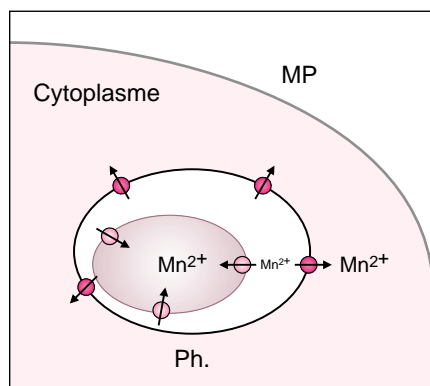


Figure 2. **Relocalisation de Nrap1 lors de la maturation phagosomique.** Immédiatement après la phagocytose (dépendante de l'actine) le phagosome (Ph.) nouvellement formé à partir de la membrane plasmique (MP) entreprend sa migration le long du réseau des microtubules. Sa maturation est déclenchée par une suite d'épisodes de fusions membranaires avec des vésicules appartenant aux systèmes endosomique (endosome précoce, EP; endosome tardif ET, gris clair) et lysosomal (Ly., gris foncé). Progressivement le milieu intraphagosomique est altéré de manière à créer un micro-environnement défavorable à la croissance microbienne (I-II, exemple: privation de nutriments, accumulation de produits cytotoxiques) et à permettre la destruction du corps ingéré (III). Différentes étapes du processus de maturation du phagosome ont été corrélées à l'acquisition de marqueurs moléculaires tel Lamp1. La répartition intracellulaire de Lamp1 et Nrap1, ainsi que leurs cinétiques de recrutement dans la membrane phagosomique sont très voisines.

réplication et, d'autre part, les réseaux endosomique et lysosomal jouent un rôle primordial dans la destruction des cibles intracellulaires par le macrophage ([34], *figure 2*). En effet, les parasites intracellulaires entrent dans le phagocyte à l'intérieur d'une vésicule de membrane plasmique, le phagosome, qui possède très peu d'activité bactéricide intrinsèque. Lors de sa maturation, le phagosome se transforme en une vacuole dans laquelle sont concentrées nombre d'activités cytotoxiques, par une série de fusions successives avec des vésicules d'origine endosomique et lysosomale, qui culmine avec la formation d'un phago-lysosome. Ces épisodes de fusion sont orchestrés par des protéines de type Rab et SNARE qui, en dirigeant le choix du partenaire fusogène du phagosome, déterminent l'acquisition d'un arsenal de fonctions bactéricides telles que acidification, production de radicaux oxygénés, accumulation d'une multitude de porines/défensines et protéases lysosomales [34]. L'étude



**Figure 3. Rôle possible de Nramp1 dans la séquestration de l'ion manganèse.** L'ion manganèse est un oligo-élément essentiel à la croissance et peu abondant. Il agit comme co-facteur dans de nombreuses réactions enzymatiques. (chez la levure, l'absorption de  $Mn^{2+}$  est déterminée par l'expression dans la membrane plasmique de la protéine Smf1 fonctionnelle). De la même manière, il apparaît possible que les homologues exprimés par les phagocytes, Nramp1, et leur parasite, « Bcg-Smf1 », puissent contribuer à la déplétion d'ions  $Mn^{2+}$  de l'espace intraphagosomique. MP: membrane plasmique.

parallèle des interactions entre parasites intracellulaires et macrophages révèle la multitude des mécanismes élaborés par les pathogènes pour survivre dans un environnement inhospitalier; c'est l'équilibre délicat entre deux systèmes compétitifs qui détermine l'issue de l'infection (destruction ou parasitisme).

Le comportement intracellulaire des parasites dont la réplication est affectée ou non par la présence de Nramp1 peut être maintenant analysé en relation avec la localisation intracellulaire de la protéine, et sa cinétique de recrutement par le phagosome. Par exemple, les parasites intracellulaires affectés par Nramp1 tels *S. typhimurium* [35], *B. abortus* [36], *M. tuberculosis* [37], et *L. donovani* [38] semblent tous (1) transiter par le phagosome; (2) demeurer à l'intérieur de cette structure durant sa maturation; (3) inhiber la fusion du phagosome avec certaines vésicules endosomiques et lysosomales ou (4) pouvoir survivre à l'intérieur du phago-lysosome mûr. Les phagosomes contenant ces parasites acquièrent le marqueur Lamp-1, et probablement du même coup, Nramp1 (présents dans les mêmes vésicules, *figure 2*). En revanche, des parasites intracellulaires dont la réplication n'est pas affectée par Nramp1 (Gros *et al.*, non publié) ne semblent pas associés avec un phagosome contenant Lamp1/Nramp1: *L. monocytogenes* s'évade rapidement du phagosome après l'épisode de phagocytose [39] alors que *L. pneumophila* induit la formation d'un phagosome particulier [40] qui ne peut fusionner avec aucun partenaire endosomique ou lysosomal. Il semble donc *a priori* qu'une bonne corrélation existe entre le comportement intracellulaire des pathogènes intracellulaires et leur sensibilité à des mutations du gène *Nramp1*.

Malgré les efforts considérables déployés pour comprendre le rôle biochimique de Nramp1, son mécanisme d'action reste à ce jour inconnu. Nous avons proposé que la protéine Nramp1 modifie le contenu intravésiculaire du phagosome pour le rendre bactériostatique et non propice à la réplication microbienne [15]. Les prédictions structurales et fonctionnelles fondées sur l'analyse de l'évolution des séquences de la

famille Nramp identifiées jusqu'alors indiquent la présence de caractéristiques propres aux familles de transporteurs ou de canaux ioniques, et suggèrent que Nramp1 pourrait modifier la concentration intraphagosomique d'une espèce ionique [27]. Une étude récente chez la levure indique que la protéine analogue Smf1, exprimée dans la membrane plasmique, est impliquée dans le transport de l'ion manganèse [31]. Il est donc intéressant de spéculer que la famille Nramp pourrait transporter des cations divalents tels que le calcium, le manganèse, le magnésium, le cobalt, ou autres (*figure 3*). Les auteurs de cette étude ont en effet proposé que Nramp1 pourrait agir comme transporteur de manganèse dans la membrane phagosomique [31], afin de dépléter l'espace vacuolaire d'un co-facteur essentiel à l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme importante synthétisée par les bactéries et qui bloque l'effet bactéricide de ce superoxyde. Des études sont en cours afin de tester cette hypothèse. Finalement, la récente découverte d'analogues de Nramp chez les bactéries, incluant plusieurs espèces de mycobactéries, suggèrent que les bactéries (y compris les parasites intracellulaires) ont, elles aussi, un système de transport qui pourrait entrer en compétition avec Nramp1 pour un même substrat (*figure 3*). Si tel est le cas, l'étude du mutant de souris *Bcg* aurait donc permis de mettre à jour un fascinant système parallèle et compétitif de transport contrôlant l'accès à un substrat fondamental à l'intérieur du phagosome ■

#### Remerciements

Les auteurs remercient S. Gruenheid pour la communication de résultats avant publication et M. Javicoli pour ses commentaires éditoriaux.

#### TIRÉS À PART

M. Cellier.



## Summary

### The *NRAMP1* gene: resistance to intracellular infections and antimicrobial activity of phagocytes

The murine gene *Bcg/Lsh/Ity* controls innate resistance to various intracellular parasites. Loss of function mutations at *Bcg* are characterized by unrestricted growth of intracellular parasites such as *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophages. A positional cloning strategy led to the identification of the candidate gene *Nramp1* (natural resistance associated macrophage protein 1) which encodes an integral membrane phospho-glycoprotein composed of 12 putative transmembrane segments (TM). A single point mutation G169D within TM4 prevents normal expression of the protein and determines a susceptible phenotype similar to the experimental *Nramp1* gene knockout. *Nramp1* belongs to an evolutionary conserved family of membrane proteins. In mammals, two paralogous genes are known and distinguished by their sequence conservation, chromosomal localization and mRNA expression pattern. While *Nramp2* is quasi-ubiquitously expressed, *Nramp1* expression is restricted to professional phagocytes (granulocytes and macrophages). The murine macrophage *Nramp1* protein is expressed intracellularly and is recruited to the phagosomal membrane in which reside various types of intracellular parasites which growth is under the control of *Bcg/Nramp1* alleles. Homologous genes have been identified in birds, invertebrates, plants, fungus and bacteria and sequences analyses predict a consensus topological model reminiscent of ion transport/permeation pathways. The yeast *Smf1* homolog is expressed at the plasma membrane and has been implicated in  $Mn^{2+}$  uptake. It is interesting to speculate that *Nramp1* and homologs expressed by intracellular parasites may compete for the uptake of  $Mn^{2+}$  ions from the intraphagosomal space and gain a metabolic advantage crucial for the outcome of their interactions.

## V<sup>e</sup> Symposium de Génétique Humaine

Jeudi 22 mai 1997

Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis  
10, avenue de Verdun, 75010 PARIS

Métro : Gare de l'Est

## Programme

### Le génome, et au-delà ?

9 h 00 Allocutions d'ouverture :

- Jean Dausset
- Daniel Kuntz

#### SESSION 1 : De la bactérie à l'homme Président : François Gros

- 9 h 15 Patrick Forterre, Les génomes compacts  
9 h 40 André Goffeau, Le génome de la levure  
10 h 05 Luca Cavalli-Sforza, L'homme et la diversité de son génome

#### SESSION 2 : De la séquence du gène à la structure de son produit

- 11 h 15 Jean-Marc Lhoste

#### SESSION 3 : Prix Hélène-Anavi Présidents : Jean Dausset, Peter Goodfellow

- 11 h 45 Présentation des 4 résumés sélectionnés

#### SESSION 4 : De la séquence du gène à sa fonction Président : Axel Kahn

- 14 h 45 Dari Shalon, Use of micro-arrays for gene expression study  
15 h 10 Jacques Camonis, Criblage systématique des interactions protéiques  
15 h 35 Bernard Dujon, Recherche systématique de la fonction des gènes de levure

#### SESSION 5 : De la séquence du gène aux modèles de pathologies humaines Président : Gilles Thomas

- 16 h 45 Charles Babinet, Modifications programmées du génome de la souris  
17 h 10 Yves Beuzard, Modèles murins des hémoglobinopathies  
17 h 35 Marco Giovannini, Contrôle spatio-temporel de l'oncogenèse  
18 h 00 Gilles Thomas, Conclusions générales

### Appel de résumés pour le Prix Hélène-Anavi

*Le Prix Hélène-Anavi, d'un montant de 20 000 francs, est destiné à récompenser un jeune chercheur, de 35 ans au plus, pour des travaux de recherche fondamentale ou clinique en génétique humaine. Il sera décerné après présentation orale de 4 résumés, sélectionnés par le Comité Scientifique du Symposium.*

*La date limite d'envoi du résumé est le 22 mars 1997*

### Organisateurs

Jean Dausset, Gilles Thomas et Christine Bellanné, Fondation Jean-Dausset – CEPH. Daniel Kuntz, Faculté Lariboisière-Saint-Louis.

Pour toute information

(programme, bulletin d'inscription et formulaire de résumé) contacter :  
Francine BOISGARD – Fondation Jean-Dausset – CEPH  
27, rue Juliette-Dodu – 75010 PARIS

Tél. : 01 53 72 50 50

E-mail:boisgard@cephb.fr

Fax : 01 53 72 50 58

http://www.cephb.fr/