

Université de Montréal

Étude du rôle spécifique du système à deux composantes PhoBR et du système Pst (phosphate specific transport) dans la virulence d'une souche pathogène aviaire de *Escherichia coli* (APEC).

par

Nicolas Bertrand

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Décembre 2009

© Nicolas Bertrand, 2009

**Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire**

**Ce mémoire intitulé
Étude du rôle spécifique du système à deux composantes PhoBR et du système
Pst (phosphate specific transport) dans la virulence d'une souche pathogène
aviaire de *Escherichia coli* (APEC).**

**présenté par
Nicolas Bertrand**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**J. Daniel Dubreuil
Président-rapporteur**

**Josée Harel
Directrice de recherche**

**Charles M. Dozois
Codirecteur de recherche
INRS-Institut Armand Frappier**

**George Szatmari
Membre du jury**

RÉSUMÉ

Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) sont responsables d'infections respiratoires et de septicémies chez la volaille. Le régulon Pho est contrôlé conjointement par le système à deux composantes PhoBR et par le système de transport spécifique du phosphate (Pst). Afin de déterminer l'implication de PhoBR et du système Pst dans la pathogenèse de la souche APEC O78 χ 7122, différentes souche mutantes *phoBR* et *pst* ont été testées pour divers traits de virulence *in vivo* et *in vitro*. Les mutations menant à l'activation constitutive du régulon Pho rendaient les souches plus sensibles au peroxyde d'hydrogène et au sérum de lapin comparativement à la souche sauvage. De plus, l'expression des fimbriae de type 1 était affectée chez ces souches. L'ensemble des mutants Pho-constitutifs étaient aussi significativement moins virulents que la souche sauvage dans un modèle de coinfection de poulet, incluant les souches avec un système Pst fonctionnel. De plus, l'inactivation du régulateur PhoB chez un mutant Pst restaure la virulence. Par ailleurs, l'inactivation de PhoB n'affecte pas la virulence de la souche χ 7122 dans notre modèle. De manière intéressante, le degré d'atténuation des souches mutantes corrèle directement avec le niveau d'activation du régulon Pho. Globalement, les résultats indiquent que l'activation du régulon Pho plutôt que le transport du phosphate via le système Pst joue un rôle majeur dans l'atténuation des APEC.

Mots-clés : *Escherichia coli*, virulence, régulon Pho, Système à deux composantes.

ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains are associated with respiratory infections and septicemia in poultry. The Pho regulon is jointly controlled by the two-component regulatory system PhoBR and by the phosphate-specific transport (Pst) system. To determine the involvement of the PhoBR regulon and the Pst system in the pathogenesis of the APEC O78 strain χ 7122, different *phoBR* and *pst* mutant strains were tested for *in vivo* and *in vitro* virulence traits. Mutations resulting in constitutive activation of the Pho regulon rendered strains more sensitive than the wild-type to hydrogen peroxide and to the bactericidal effects of rabbit serum. In addition, production of type 1 fimbriae was also impaired in these strains. Using a chicken competitive infection model, all PhoB constitutive mutants were out-competed by the wild-type parent, including strains containing a functional Pst system. In addition, cumulative inactivation of the Pst system and the PhoB regulator resulted in a restoration of virulence. Loss of the PhoB regulator alone did not affect virulence in the chicken infection model. Interestingly, the level of attenuation of the mutant strains correlated directly with the level of activation of the Pho regulon. Overall, results indicate that activation of the Pho regulon rather than phosphate transport by the Pst system plays a major role in the attenuation of APEC.

Keywords : *Escherichia coli*, virulence, Pho regulon, Two-component system.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	3
ABSTRACT.....	4
LISTE DES TABLEAUX.....	9
MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS - ARTICLE.....	9
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES CIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	11
REMERCIEMENTS	15
INTRODUCTION.....	16
RECENSION DES ÉCRITS	19
1. RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	20
<i>1.1 ARN polymérase.....</i>	<i>20</i>
<i>1.2 Facteurs de transcription.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3 Systèmes à deux composantes</i>	<i>21</i>
<i>1.4 Famille des histidines kinases</i>	<i>22</i>
<i>1.5 Famille des éléments régulateurs.....</i>	<i>23</i>
<i>1.6 Famille des protéines de liaison.....</i>	<i>24</i>
2. RÉGULON PHO	25
<i>2.1 Régulon Pho.....</i>	<i>25</i>
<i>2.2 La protéine senseur PhoR.....</i>	<i>25</i>
<i>2.3 La protéine régulatrice PhoB.....</i>	<i>26</i>
<i>2.4 Boîte Pho.....</i>	<i>27</i>
<i>2.5 Le Transporteur PstSCAB.....</i>	<i>28</i>
<i>2.6 PhoU</i>	<i>29</i>
<i>2.7 Théories du mécanisme de transition du régulon Pho</i>	<i>30</i>
<i>2.8 Théories comportementales du régulon Pho.....</i>	<i>32</i>
<i>2.9 Évolution du régulon Pho</i>	<i>33</i>
3. PHÉNOTYPES ASSOCIÉS AU RÉGULON PHO CHEZ E. COLI.....	34

3.1 <i>E. coli</i> non-pathogène	34
3.3 <i>E. coli</i> entéro-invasive (EIEC)	34
3.4 <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC)	35
3.5 <i>E. coli</i> responsable d'infections extra-intestinales (ExPEC)	36
4. CONSERVATION DU RÉGULON PHO CHEZ DIVERS GENRES BACTÉRIENS	39
4.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
4.2 <i>Bacillus subtilis</i>	39
4.3 <i>Campylobacter jejuni</i>	40
4.4 <i>Caulobacter crescentus</i>	41
4.5 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	41
4.6 <i>Clostridium acetobutylicum</i>	41
4.7 <i>Clostridium perfringens</i>	42
4.8 Cyanobactéries	42
4.9 <i>Mycobacterium smegmatis</i>	42
4.10 <i>Myxococcus xanthus</i>	43
4.11 <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	43
4.12 <i>Serratia</i> sp.	44
4.13 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	44
4.14 <i>Shigella flexneri</i>	45
4.15 <i>Streptomyces coelicolor</i>	45
4.16 <i>Streptomyces lividans</i>	46
4.17 <i>Streptomyces natalensis</i>	46
4.18 <i>Synechocystis</i> sp.	47
4.19 <i>Proteus mirabilis</i>	47
4.20 <i>Pseudomonas aureofaciens</i>	47
4.21 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
4.22 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
4.23 <i>Vibrio cholerae</i>	49
4.24 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
5. STRATÉGIES ALTERNATIVES À L'UTILISATION D'ANTIBIOTIQUES	50
5.1 Molécules thérapeutiques ciblant les TCS	50
5.2 Vaccins de souches atténués concernant les TCS	51
5.3 Interférence avec des traits de virulence	51

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS – ARTICLE	53
INCREASED PHO REGULON ACTIVATION CORRELATES WITH DECREASED VIRULENCE OF AVIAN PATHOGENIC <i>ESCHERICHIA COLI</i>	54
ABSTRACT	56
INTRODUCTION	57
MATERIALS AND METHODS	59
<i>Bacterial strains, plasmids, primers, and media.....</i>	<i>59</i>
<i>Generation of the phoR(T220N) mutant by allelic exchange.....</i>	<i>59</i>
<i>Construction of mutant derivatives of APEC strain χ7122</i>	<i>60</i>
<i>Alkaline phosphatase assay.....</i>	<i>60</i>
<i>Sensitivity of E. coli strains to hydrogen peroxide.....</i>	<i>61</i>
<i>Serum bactericidal assay</i>	<i>61</i>
<i>Yeast cell aggregation assay.....</i>	<i>61</i>
<i>Experimental infection of chickens via the air sacs</i>	<i>62</i>
<i>Statistical analyses</i>	<i>62</i>
RESULTS	63
<i>Virulence determinants</i>	<i>64</i>
<i>Competitive coinfection model for APEC virulence.....</i>	<i>65</i>
DISCUSSION.....	66
<i>The virulence phenotype in APEC χ7122 is dependent on the activation level of the Pho regulon.....</i>	<i>68</i>
<i>Constitutive Pho activity results in reduced virulence in chickens</i>	<i>70</i>
ACKNOWLEDGEMENTS	71
REFERENCES.....	71
FIGURES AND TABLES.....	77
DISCUSSION GÉNÉRALE.....	85
1. APEC	87
2. ÉTAT D'ACTIVATION DU RÉGULON PHO CHEZ LES DIFFÉRENTS MUTANTS	87
3. L'ACTIVITÉ DU RÉGULON PHO MÈNE À L'ATTÉNUATION DE LA VIRULENCE.....	88
4. PHOB N'EST PAS NÉCESSAIRE À LA VIRULENCE	89

5. LE DEGRÉ DE VIRULENCE CORRÈLE AVEC LE TAUX D'ACTIVATION DU RÉGULON PHO.....	89
6. COMPLÉMENTATION DES MUTANTS.....	90
7. L'ACTIVATION DU RÉGULON PHO DIMINUE LA PRODUCTION DES FIMBRIAE DE TYPE 1.....	90
8. L'ACTIVATION DU RÉGULON PHO RÉDUIT LA RÉSISTANCE AU STRESS OXYDATIF... 	91
9. L'ACTIVATION DU RÉGULON PHO RÉDUIT LA RÉSISTANCE À L'EFFET BACTÉRICIDE DU SÉRUM.....	91
10. L'ACTIVATION DU RÉGULON PHO AFFECTE LA VIRULENCE <i>IN VIVO</i>	92
CONCLUSION	93
PERSPECTIVES	95
SOURCES DOCUMENTAIRES.....	97

LISTE DES TABLEAUX

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS - ARTICLE

Table 1: Strains and plasmids used in this study.	77
Table 2: Primers used for PCR amplifications.....	78
Table 3: Alkaline phosphatase activities of χ 7122, isogenic mutants and complemented strains in high (LB) or low (LP) phosphate medium.	78
Table 4: Growth inhibition zone of APEC χ 7122, isogenic mutants and complemented strains to hydrogen peroxide.....	79

LISTE DES FIGURES

RECENSION DES ÉCRITS

Figure 1. Système à deux composantes	22
Figure 2. Positionnement d'un homodimère PhoB-PhoB sur l'ADN.....	27
Figure 3. Opéron <i>pstSCAB-phoU</i> et petit ARN régulateur de <i>rpoS</i>	29
Figure 4. Interactions entre PhoB, PhoR, PhoU et CreC chez <i>E. coli</i>	32

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS - ARTICLE

Figure 1. Bacterial resistance to serum of APEC χ 7122, isogenic mutants and complemented strains.	79
Figure 2. Minimal bacterial titers allowing yeast agglutination of APEC χ 7122, isogenic mutants and complemented strains.	80
Figure 3. Competitive indexes from different organs of chickens coinfecting with APEC χ 7122 isogenic mutants and virulent χ 7122 Δ <i>lacZ</i> derivative strain QT51.	81

LISTE DES CIGLES ET ABRÉVIATIONS

acP	Acétyle phosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
Antigène F	Antigène flagellaire
Antigène K	Antigène capsulaire
Antigène O	Antigène oligosaccharidique
AP	Phosphatase alcaline
APEC	<i>E. coli</i> pathogène aviaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messsager
ARNP	ARN polymérase
ATP	Adénosine triphosphate
BCG	Bacille Calmette-Guérin
C-terminal	Domaine carboxy-terminal
CPCFQ	Commission permanente de coopération franco-québécoise
CFU	Unité formatrice de colonie
CI	Index de compétition
Cm	Chloramphénicol
CRIP	Centre de recherche en infectiologie porcine
CRSNG	Conseil de recherche en sciences naturelles et génie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	<i>E. coli</i> entéro-invasive
EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogène
EPS I	Exopolysaccharide de succinoglycane
EPS II	Exopolysaccharide de galactoglucane
ExPEC	<i>E. coli</i> responsable d'infections extra-intestinales
ÉR	Élément régulateur
FESP	Faculté des études supérieures et post-doctorales

FMV	Faculté de médecine vétérinaire
FRET	Forster resonance energy transfer
FQRNT	Fonds québécois de la recherche sur la nature et la technologie
GREMIP	Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc
HK	Histidine kinase
IAF	Institut Armand-Frappier
INRS	Institut national de la recherche scientifique
Kan	Kanamycine
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus d'effacement des entérocytes
LP	Low-phosphate
LPS	Lipopolysaccharide
MSYA	Mannose-sensitive yeast agglutination
N-terminal	Domaine amino-terminal
Nal	Acide nalidixique
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
Pi	Phosphate inorganique
pH	Potentiel hydrogène
Pst	Transport spécifique du phosphate
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
ROS	Reactive oxygen species
STAT	Signal transducers and activator of transcription
STM	Signature-tagged mutagenesis
TLC	Chromatographie en couche mince
TCS	Système à deux composantes
UdeM	Université de Montréal
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogène
XP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate

Unité de mesure

%	Pourcentage
nm	Nanomètre
mM	Millimolaire
kb	Kilobase
μ M	Micromolaire
μ l	Microlitre
μ g	Microgramme
ml	Millilitre
OD _X	Densité optique à X nm
h	Heure
g	Gramme
vol	Volume

Symbole

α	Alpha
β	Beta
χ	Chi
©	Droits protégés
Δ	Delta
ω	Omega
σ	Sigma
∞	Infini
\pm	Plus ou moins
n	Nombre de réplias

À ma mère, Monique, pour l'amour.

À mon père, Denis, pour tout.

À ma sœur, Mélissa, pour toi.

REMERCIEMENTS

Merci à Dre Josée Harel pour la ferveur.

Merci à Dr Charles M. Dozois pour la science.

Merci à Dre Christine Martin pour la France.

Merci à Dr Michaël Mourez pour l'érudition.

Merci à l'Université de Montréal (UdeM), à la Faculté de Médecine Vétérinaire (FMV), à la fondation Jos-Rhéaume, à la fondation Marc Bourgie, à la Faculté des Études Supérieures et Post-doctorales (FESP), au Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), à la Cité de la biotechnologie agroalimentaire, vétérinaire et agroenvironnementale de Saint-Hyacinthe, au Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et la Technologie (FQRNT), à la Commission Permanente de Coopération Franco-Québécoise (CPCFQ) au Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) et au réseau APOGEE-Net/CanGèneTest pour les argents.

Merci à tous d'avoir croisé ma route.

« On va toujours trop loin pour les gens qui vont nulle part. »

Pierre Falardeau

INTRODUCTION

Depuis la découverte de l'opéron *lac* par Jacob et Monod en 1961, les connaissances progressent constamment dans la compréhension des mécanismes de régulation transcriptionnelle. La transcription est un processus essentiel pour tout le règne vivant et est même répandu chez les virus. En effet, la transcription est un phénomène biologique à la base du transfert d'informations génétiques de l'ADN à l'ARN, ce dernier étant ensuite traduit en protéines.

Les bactéries pathogènes, commensales et environnementales sont exposées à des conditions changeantes. En ce sens, la régulation transcriptionnelle joue un rôle critique dans les processus adaptatifs. Dans l'optique de survivre à ces modifications du microclimat, la physiologie bactérienne s'adapte en modifiant son métabolisme.

À ce titre, le régulon Pho exemplifie un circuit de gènes impliqués dans le maintien constant des paramètres biologiques bactériens face aux variations en phosphate. Cette homéostasie est conservée par la mise en place d'une réponse coordonnée de plusieurs éléments génétiques. Ainsi, le système à deux composantes PhoB et PhoR répond aux fluctuations des concentrations extra-cytoplasmiques en phosphate inorganique (Pi). La régulation en découlant se traduit par l'induction ou la répression directe des gènes appartenant au régulon Pho. Aussi, le système de transport spécifique du phosphate (Pst) est impliqué indirectement dans le contrôle de la réponse transcriptionnelle puisque qu'une mutation dans ce système résulte en l'activation constitutive du régulon Pho. Ce mémoire de maîtrise traite du rôle spécifique du système à deux composantes PhoBR et du système Pst dans la virulence bactérienne et particulièrement de la souche d'*Escherichia coli* pathogène aviaire (APEC) χ 7122.

Dans la prochaine section, une recension de la littérature concernant la régulation transcriptionnelle de même que l'organisation fonctionnelle et structurale des systèmes à deux composantes est abordée. Ensuite, une description détaillée du régulon Pho et des mécanismes de régulation le régissant est présentée. Aussi, divers

phénotypes associés au régulon Pho chez *E. coli* et d'autres genres bactériens sont exposés. Enfin, un tour d'horizon décrivant des stratégies alternatives à l'utilisation d'antibiotiques est effectué.

RECENSION DES ÉCRITS

1. Régulation transcriptionnelle

1.1 ARN polymérase

Les eucaryotes possèdent plusieurs espèces d'ARN polymérases (ARNP) comparativement aux bactéries qui partagent une seule et unique espèce d'ARNP. Ce complexe multi-protéique se compose des sous-unités : α_2 , β , β' , ω et σ . Puisque le noyau central de l'ARNP bactérien est constant, la variation transcriptionnelle est contrôlée par les facteurs σ (92). Afin d'initier la transcription d'une région promotrice sur la matrice d'ADN, les sous-unités $\alpha_2\beta\beta'\omega$ s'associent à un des multiples facteurs σ (21). Les facteurs σ confèrent la spécificité des ARNP envers certains promoteurs mais, les facteurs σ à eux-seuls ne peuvent pas lier l'ADN (43, 44). Chaque espèce bactérienne possède un facteur σ de ménage et un nombre variable de facteurs σ alternatifs. De plus, le nombre de facteurs σ présents dans un organisme dépend généralement de la complexité du cycle de vie de l'organisme. Par exemple, les bactéries sporulantes (*Bacillus* sp. et *Streptomyces* sp.) sont celles chez qui on dénombre le plus de facteurs σ différents. Par ailleurs, les facteurs σ alternatifs ne sont pas essentiels à la survie *in vitro* des bactéries. Autrement dit, l'inactivation d'un facteur σ alternatif n'est pas létale mais, peut néanmoins compromettre la capacité de l'organisme à causer une infection ou à survivre en réponse à un changement d'état physiologique (phase stationnaire, choc thermique, stress oxydatif, etc.) (92).

1.2 Facteurs de transcription

Le génome d'*E. coli* K-12 code pour plus de 300 facteurs de transcription. Les facteurs de transcription bactérienne peuvent agir comme des activateurs ou des répresseurs. Dans certains cas, l'activateur se lie à une séquence d'ADN en amont de la région -35 et il favorise la transcription du promoteur en interagissant avec la sous-unité α ou σ de l'ARNP (voir la section Famille des éléments régulateurs). Dans d'autres cas, l'activateur lie la région "spacer" du promoteur et crée un espacement stérique optimal pour la liaison de l'ARNP (47). Quant aux répresseurs, ils inhibent la transcription soit en empêchant directement la liaison de l'ARNP au promoteur ou

indirectement en occasionnant une torsion dans l'ADN en se liant à des régions distales du promoteur (23).

1.3 Systèmes à deux composantes

Les systèmes à deux composantes (TCS) sont utilisés par le règne procaryote pour s'adapter de manière coordonnée aux conditions environnementales telles l'osmolarité, le chimiotactisme, les carences nutritionnelles et même la résistance aux antibiotiques et la virulence bactérienne (13, 133). Chez *E. coli*, une première étude de la séquence génomique a permis d'établir que 62 cadres de lecture ouverts correspondaient à des membres de TCS, dont 32 éléments régulateurs (ÉR) et 23 histidines kinases (HK) (135). Les données actuelles dénombrent, incluant les putatifs, 30 HK et 34 ÉR (231). Par ailleurs, la délétion systématique de chacun des 31 TCS d'*E. coli* K12 a démontré que 22 mutants étaient physiologiquement affectés à différents niveaux en utilisant la technologie Phenotype MicroArrays. Toujours est-il que la majorité des TCS ne sont pas nécessaires à la survie *in vitro* (238). Ce genre de système se caractérise par deux protéines possédant des activités favorisant le transfert d'information : une protéine senseur, l'HK, située dans la membrane qui détecte un signal donné et une protéine cytoplasmique, l'ÉR qui initie la réponse transcriptionnelle (Figure 1). L'HK et l'ÉR interagissent entre eux de manière spécifique en raison de domaines définis (16, 60). Or, de faibles interactions entre partenaires auxiliaires sont possibles. La réponse qui résulte de ce "cross-talk" servirait à assurer une communication et une coordination entre des réseaux de régulation connexes, améliorant ainsi l'adaptation bactérienne et sa survie (107). Certaines études vont même jusqu'à comparer les TCS à un réseau neuronal faisant preuve d'une mémoire et d'auto-amplification (74). Par ailleurs, l'absence des TCS des cellules humaines en font des cibles potentielles pour le développement de molécules alternatives à l'utilisation des antibiotiques courants (146, 190, 217).

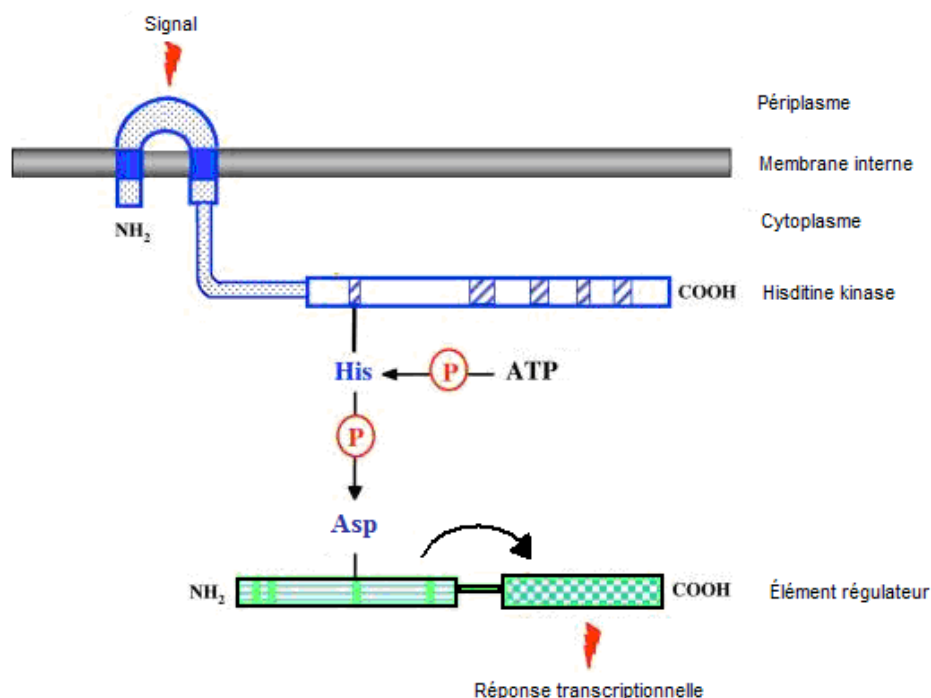


Figure 1. Système à deux composants, adapté de Depardieu *et al.* (38).

Un signal périplasmique est perçu par l’histidine kinase localisée dans la membrane interne. Ceci entraîne l’autophosphorylation de l’histidine kinase sur un résidu histidine. S’en suit le phosphotransfert à l’élément régulateur partenaire sur un résidu aspartate. Ainsi, l’élément régulateur change de conformation et initie une réponse transcriptionnelle spécifique au signal de départ.

1.4 Famille des histidines kinases

Les protéines de la famille HK sont de nature homodimérique avec un domaine senseur périplasmique N-terminal couplé à un domaine kinase cytoplasmique C-terminal. Il existe une grande variabilité de signaux perçus par les HK, conséquence des différentes séquences N-terminales et illustrant les diverses fonctions auxquelles elles sont associées. L’étude des structures des différents domaines mène à la compréhension des mécanismes par lesquels les éléments senseurs reconnaissent des signaux et régulent leur activité kinase (198). La structure

des HK révèle un repliement différent comparativement à la famille des Ser/Thr/Tyr kinases (167). Les signaux peuvent être perçus soit directement par la kinase ou par des interactions protéine-protéine. En fait, les HK sont regroupées en 3 familles selon la topologie de leur domaine senseur (126). Le premier groupe, majoritaire, est caractérisé par des hélices présentes au niveau du périplasma. Le second groupe semble percevoir des perturbations associées à la membrane puisqu'il y a absence d'hélices extra-membranaires. Le troisième groupe rassemble les HK répondant aux stimuli internes. Certaines HK peuvent combiner diverses de ces propriétés. Dans tous les cas, le transfert d'information de la région senseur au domaine kinase fait probablement intervenir des changements de conformations. Quant à lui, le domaine kinase est plus fortement conservé. Le domaine kinase se divise en deux sous-domaines; une région intermédiaire et le centre catalytique. Il a pour fonction de lier l'ATP et de catalyser l'autophosphorylation d'un résidu histidine. Le groupement phosphate du résidu histidine est ensuite transféré à un résidu aspartate situé sur le domaine receveur de l'élément régulateur partenaire. Chez *E. coli*, le taux d'autophosphorylation et le niveau de phosphorylation varient selon les HK mais, sont généralement proportionnels à l'exception de ArcB, HydH, NarQ, NtrB, BasS, CheA, and CreC (231). De plus, la plupart des kinases possèdent une fonction de phosphatase. Ceci serait un mécanisme de contrôle du taux d'éléments régulateurs phosphorylés et servirait de balancier pour un retour à l'équilibre. Il a été suggéré que la fonction phosphatase soit aussi importante pour éviter le "cross-talk" (107).

1.5 Famille des éléments régulateurs

Les ÉR possèdent un domaine receveur (N-terminal), un élément flexible et un domaine effecteur (C-terminal). Les ÉR existent en équilibre sous deux états, soit activé ou inactivé. Lorsque phosphorylé, l'ÉR subit une modification de conformation vers la forme activée. La région effectrice possède généralement un site de liaison à l'ADN, accordant ainsi à l'ÉR le rôle d'activateur ou de répresseur transcriptionnel. Dans certains cas, le phosphotransfert de l'HK à l'ÉR favorise la formation de dimères qui est nécessaire pour la liaison à l'ADN. Dans d'autres cas, la

phosphorylation favorise la liaison à l'ADN sans dimérisation. Ou encore, certains ÉR peuvent liés l'ADN sans phosphorylation mais, en ont besoin pour interagir avec la machinerie transcriptionnelle (167). Certains des ÉR interagissent avec la sous-unité σ^{70} tels que PhoB (14) tandis que d'autres sont spécifiques à σ^{54} tels que LuxO chez *Vibrio cholerae* (111). En supplément à leur capacité de phosphotransfert, les ÉR catalysent leur propre inactivation via l'hydrolyse de l'acyl-phosphate. La demi-vie des ÉR phosphorylés varie d'une fraction de seconde à des heures dépendamment entre autre, de l'obstruction stérique du groupement phosphaté le protégeant ainsi d'être hydrolysé. Ainsi, selon leurs structures, il est possible d'évaluer la cinétique d'auto-déphosphorylation des ÉR (150). Par ailleurs, en utilisant la technique de FRET (Forster resonance energy transfer) et l'ÉR PhoB comme modèle, il a été démontré que les ÉR ont la capacité de former des hétéro-dimères avec des ÉR spécifiques. Ceci ouvre donc la porte a une "cross-régulation" de certains circuits métaboliques (61).

1.6 Famille des protéines de liaison

Il existe un mécanisme régulationnel par lequel une protéine relie deux TCS distincts. Du coup, un TCS peut répondre au signal spécifique d'un second TCS en favorisant la forme phosphorylée de l'élément régulateur du second TCS. Chez *Salmonella*, ceci est exemplifié par la protéine PmrD reliant PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ. Ainsi, lorsque PhoP (ÉR) est activé par PhoQ (HK), PmrD est transcrit et se lie à l'ÉR PmrA favorisant sa phosphorylation. Enfin, PmrA régule à son tour les gènes sous sa gouverne en absence du signal d'induction de l'HK PmrB (91). Chez *E. coli*, l'équivalent de ce système est caractérisé par la protéine B1500 qui relie EvgS/EvgA et PhoQ/PhoP. Dans ce cas, B1500 interagit avec PhoQ (ÉR), indépendamment de PhoQ (HK), suite à l'activation du TCS EvgS/EvgA (48).

2. Régulon Pho

2.1 Régulon Pho

Lors d'une carence en phosphate chez *E. coli*, 208 protéines sont surproduites et 205 protéines sont synthétisées à la baisse. L'ensemble de ces 413 protéines compose le stimulon phosphate (208). Cependant, seuls les gènes possédant des sites reconnus par la protéine régulatrice PhoB sont considérés comme des membres du régulon Pho (213). En ce sens, 47 gènes répartis en opéron ou de manière monocistronique appartiennent au régulon Pho (10, 93, 196, 213). La régulation transcriptionnelle de ces gènes est sous le contrôle du TCS PhoBR (216), lui-même étant régulé de manière autogène (215). Ainsi, le régulon Pho constitue le réseau de gènes répondant aux variations en phosphate. Par contre il est reconnu que le régulon Pho peut intervenir dans divers autres aspects physiologiques de la bactérie tels que la formation de biofilms, la composition membranaire et diverses réponses aux stress (106).

2.2 La protéine senseur PhoR

Chez *E. coli*, PhoR est l'HK du régulon Pho. Cette HK est constituée de 431 acides aminés et est fortement similaire à EnvZ, indiquant qu'elles partagent un ancêtre commun (120). Cinq domaines ont été identifiés en comparant PhoR avec la structure tridimensionnelle élucidée de EnvZ. En extrémité N-terminale se retrouve une région hydrophobique de 50 acides aminés ancrant la protéine dans la membrane interne grâce à deux segments transmembranaires (230). Ce domaine déborde légèrement dans le périplasme, ce qui laisse penser qu'il pourrait contenir un site où le signal est perçu (174). La séquence suivante de 35 acides aminés est en forme d'hélice α et est fortement chargée positivement, stabilisant ainsi l'interaction avec la membrane. Ensuite, les résidus 109 à 196 sont responsables du transfert du signal en interagissant avec PhoB. La région comprise entre les acides aminés 193 et 267 abrite le site de dimérisation et de phosphorylation. Des mutations dans cette région induisent des phénotypes altérés d'activation du régulon Pho (229). Quant à la région C-terminale, elle fournit l'énergie nécessaire à l'autophosphorylation grâce à un

domaine catalytique et de liaison à l'ATP. Pour résumer, lorsque les concentrations périplasmiques sont inférieures à 4 μM , PhoR s'autophosphoryle sur un résidu histidine en position 213. S'en suit le phospho-transfert à l'élément régulateur PhoB sur un résidu acide aspartique, un processus nécessitant la présence de Mg^{2+} comme cofacteur. De plus, PhoR agit aussi à titre de phosphatase de PhoB-activé et cette activité serait localisée dans la région de dimérisation et de phosphorylation (25).

2.3 La protéine régulatrice PhoB

Chez *E. coli*, PhoB est l'ÉR du régulon Pho. PhoB est composé de 229 acides aminés et est fortement apparenté à OmpR, indiquant qu'ils partagent un ancêtre commun (119). De nature cytoplasmique, PhoB contient 2 domaines. En région N-terminale (résidus 1 à 122) se retrouve le domaine receveur dont l'acide aspartique en position 53 qui est la cible du phospho-transfert. Le site actif du domaine receveur regroupe des acides aminés conservés, dont ceux nécessaires à la liaison du magnésium (239). En région C-terminale (résidus 131 à 129), se trouve le domaine effecteur (116). En fait, la phosphorylation du domaine receveur est requise pour l'activation de PhoB ce qui augmente son affinité aux boîtes Pho (50). Au niveau structural, l'hélice $\alpha 5$ du domaine receveur inhibe le domaine effecteur (4). La phosphorylation de PhoB induit un changement conformationnel grâce à la région flexible unissant les deux domaines (148). Ceci libère la région effectrice allouant ainsi la dimérisation de PhoB (57). Plus précisément, des études de cristallographie ont révélé que la dimérisation se produit au niveau de la face $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ du domaine receveur (6, 114). Le domaine effecteur est ensuite à même de lier l'ADN en tandem de manière symétrique (8). Cette liaison PhoB-ADN ne modifie pas de manière significative la structure de PhoB (232). En fait, PhoB s'insère via l'hélice $\alpha 3$ dans le sillon majeur de l'ADN et le résidu Arg219 du feuillet β s'oriente dans le sillon mineur de l'ADN (Figure 2). Ainsi, PhoB se positionne de manière à interagir avec la sous-unité σ^{70} de l'ARNP via l'hélice $\alpha 1$ (14, 94, 117), ce qui différencie PhoB de OmpR, puisque OmpR recrute l'ARNP via la sous-unité α de celle-ci (99, 124, 147). Il est aussi connu que PhoB partage le contrôle de la transcription de certains gènes

avec d'autres éléments régulateurs. En effet, il a été démontré par la technique de footprint que PhoB se lie à la région promotrice de *psiE*, promoteur qui est aussi reconnu par cAMP-CRP, l'ÉR des variations quantitatives en carbone. Ainsi, l'expression de *psiE* est sous le contrôle positif de PhoB et le contrôle négatif de cAMP-CRP (93).

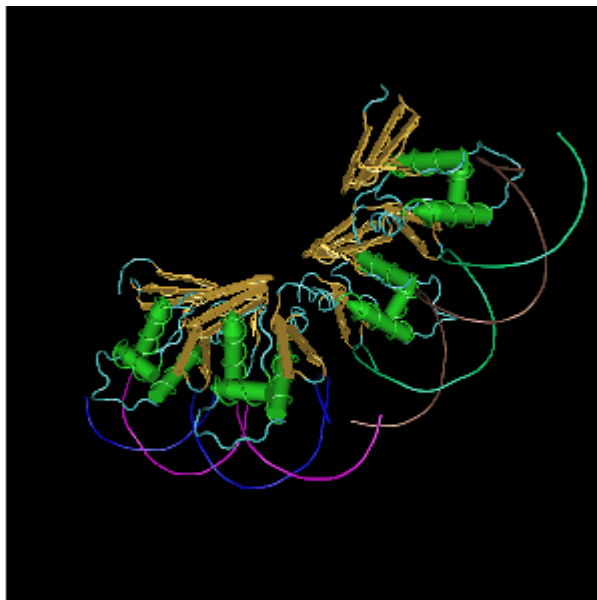


Figure 2. Positionnement d'un homodimère PhoB-PhoB sur l'ADN, issu de Blanco *et al.* (14).

La liaison de PhoB à l'ADN s'effectue en tandem. L'hélice $\alpha 3$ s'insère dans le sillon majeur de l'ADN et le résidu Arg219 s'oriente dans le sillon mineur de l'ADN. La position de PhoB est favorable à une interaction avec la sous-unité σ^{70} de l'ARNP.

2.4 Boîte Pho

Les boîtes Pho représentent une séquence consensus d'ADN, soit : 5'-CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)-3' (96, 118, 213). En fait, cette séquence se compose de 2 répétitions nucléotidiques, espacées de 4 nucléotides, où chacune est reconnue par une unité de l'homodimère PhoB-PhoB (14). Les boîtes Pho se substituent généralement à la région -35 des promoteurs régulés par PhoB. Dans

certains cas, le positionnement des boîtes Pho peuvent entraîner l'inhibition de la transcription des gènes en aval (179). De plus, il semble que la présence d'un grand nombre de boîtes Pho compense pour la dégénérescence de certaines boîtes Pho (14). Par ailleurs, le régulateur global IHF (Integration host factor) se lie à la région promotrice de l'opéron *pst* mais non au promoteur de *phoA*, deux membres du régulon Pho (185). En fait, cette spécificité est attribuable à une cytosine en position -13 (201). Ainsi, les séquences des boîtes Pho influencent la compétition entre les sous-unités σ^D et σ^S dans la formation de l'ARNP (200). En considérant diverses variables, il est possible de réaliser une matrice mathématique et d'appliquer l'algorithme résultant à divers génomes afin d'identifier les boîtes Pho putatives. Il n'en demeure pas moins que les candidats doivent être confirmés par des approches de biologie moléculaire (235).

2.5 Le Transporteur PstSCAB

Le système de transport spécifique du phosphate (Pst) est un transporteur actif de type ABC de haute affinité pour le phosphate inorganique (224). Le système Pst est un membre du régulon Pho. Il est codé par l'opéron *pstSCAB-phoU* (195) et sa transcription est induite lors d'une carence en phosphate via PhoB (96). Néanmoins, le transcrit *pstSCAB-phoU* est dégradé en fragments suggérant une régulation post-transcriptionnelle rapide (3). De plus, le nombre de fragments d'ARNm de *pstS* est significativement plus abondant ce qui se traduit par une plus grande concentration cellulaire de PstS comparativement aux autres membres du système Pst. Ceci s'explique par la présence d'une structure palindromique REP (Repetitive Extragenic Palindromic) située en aval du locus de *pstS* (2). Cette séquence répétée favorise la stabilité du transcrit *pstS* en inhibant sa dégradation par les exonucléases (3). De plus, une région intergénique entre *pstA* et *pstB* possède une homologie de séquence avec le transcrit de *rpoS* en 5' (Figure 3). Ainsi, il se pourrait que cette région soit un petit ARN régulateur post-transcriptionnel positif de RpoS (175). Au niveau fonctionnel, PstS est une protéine périplasmique possédant un site de fixation spécifique pour les anions $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-} (108). PstA et PstC forment le canal dans la membrane

interne (32). Il a été proposé que la structure du canal dépende de l'interaction entre deux prolines de PstA et PstC gouvernant l'état d'ouverture et de fermeture de celui-ci (218). La protéine PstB lie et hydrolyse l'ATP fournissant ainsi l'énergie requise pour le transport actif du phosphate en provenance du périplasma vers le cytoplasme (27, 33).

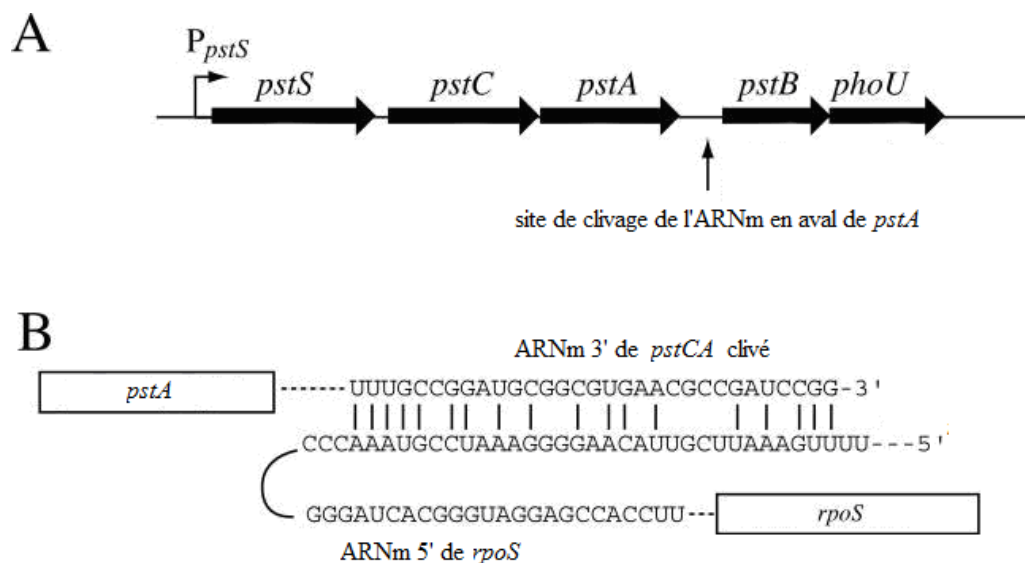


Figure 3. Opéron *pstSCAB-phoU* et petit ARN régulateur de *rpoS*, adapté de Schurdell *et al.* (175).

(A) L'opéron est transcrit d'un promoteur unique et est ensuite clivé en plusieurs fragments. (B) Homologie de séquence entre la région 3' de l'ARNm de *pstA* et la région 5' de l'ARNm de *rpoS*.

2.6 PhoU

La protéine cytosolique PhoU est codée par le gène terminal de l'opéron *pstSCAB-phoU*. En supplément à sa régulation en tant que membre du régulon Pho, PhoU pourrait aussi répondre à un autre système transcriptionnel ou même être régulé de manière autogène (142). Le rôle de PhoU n'est pas défini hors de tout doute. Néanmoins, les études tendent à démontrer que PhoU agit à titre de régulateur négatif

du TCS PhoBR (142, 186). En ce sens, PhoU connecterait PhoR et le système Pst (142). Aussi, PhoU favoriserait la déphosphorylation de PhoB ou interférerait dans la formation du complexe d'activation PhoB-PhoR en interagissant avec le domaine ATPase de PhoR (145). Cette capacité serait attribuable à une structure similaire de type STAT (Signal Transducers and Activator of Transcription). De plus, un motif E(D)XXXD conservé pourrait être un site de liaison pour un cofacteur métallique tel le fer ou le nickel (112). Par ailleurs, il a été montré que PhoU n'a pas d'impact sur l'import du phosphate puisque le système Pst est intact et fonctionnel lorsque PhoU est absent. Toutefois, une délétion de *phoU* occasionne un sévère défaut de croissance. Ceci s'expliquerait par le fait que PhoU est impliqué dans la synthèse d'ATP (186) ou bien par un niveau anormalement élevé de synthèse du système Pst délétère à la bactérie (72).

2.7 Théories du mécanisme de transition du régulon Pho

Le contrôle du régulon Pho dépend principalement du TCS PhoBR en réponse à une carence en phosphate inorganique (121). Or, la transition de l'état activé à l'état réprimé résulte de paramètres complexes (206). En effet, le système Pst est connu comme étant un régulateur négatif de PhoBR puisque chez des mutants Pst, le régulon Pho est activé de manière constitutive (indépendamment des concentrations de phosphate inorganique). Ceci semble donc indiqué que le système Pst est couplé moléculairement à PhoR et/ou à PhoB (32, 164). Toutefois, les résultats de microscopie confocale de la collection ASKA indique clairement que le système Pst se retrouve à la grandeur de la bactérie comparativement à PhoR qui se limite aux pôles cellulaires (97). De plus, le transport du phosphate en lui-même ne semble pas être impliqué dans le mécanisme de régulation. En effet, une mutation ponctuelle *pstA(R220Q)* bloque l'import du phosphate sans pour autant activer de manière constitutive le régulon Pho. Fait à noter, ce mutant conserve la capacité d'activer la transcription des gènes Pho lors d'une carence en phosphate (32). Ceci étant, la concentration intracellulaire en phosphate pourrait être l'élément déclencheur de la transition du régulon Pho. En fait, l'activation constitutive du régulon Pho chez un

mutant Pst peut être compensée par la surexpression des transporteurs de phosphate de faible affinité, PitA et PitB (77). Ainsi, le signal d'activation du régulon Pho serait de nature interne, et impliquerait la modulation de l'activité de PhoU. Cette affirmation concorde avec le positionnement de PhoU, qui est co-localisé avec PhoR (97). De plus, ce système de régulation serait comparable à l'équivalent du régulon Pho chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (203). Toutefois, une étude par FRET a démontré que PhoU n'interagit pas directement avec PhoR ni avec PhoB (9). Le modèle proposé soutient que CreC, aussi connu sous le nom de PhoM, interagit avec PhoB avant même que ce dernier soit activé par PhoR (Figure 4). Ainsi, CreC serait l'élément senseur à la base de l'activation précoce du régulon Pho (9). Par ailleurs, il a été démontré que PhoB a la capacité de s'autophosphoryler en présence d'acétyl phosphate (acP). Cette propriété expliquerait l'activation du régulon en l'absence de PhoR et de CreC, via la surexpression du gène *ackA*, codant pour une acétate kinase responsable de l'augmentation intracellulaire du phospho-donneur acP (76). De plus, il semble que dans des conditions *in vivo*, ce circuit d'activation requiert une kinase accessoire (95). Toujours est-il que l'acP n'est pas nécessaire à l'activation de PhoB. Il aurait plutôt une influence sur la sensibilité ou l'amplitude de la réponse du régulon Pho (127).

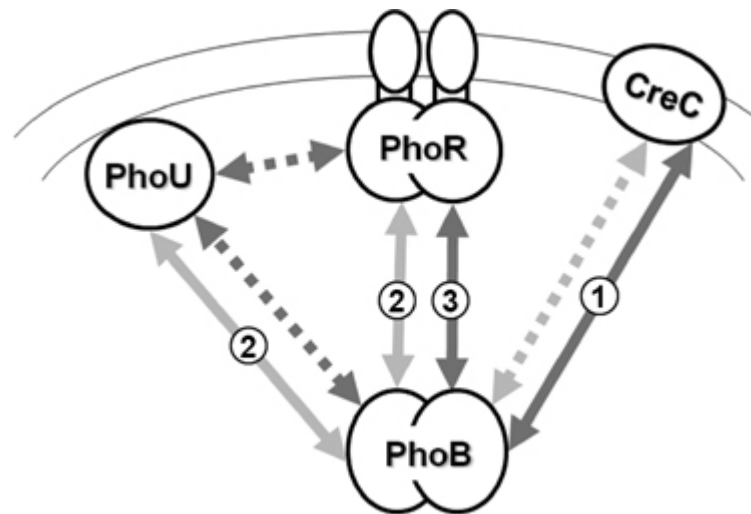


Figure 4. Interactions entre PhoB, PhoR, PhoU et CreC chez *E. coli*, issu de Baek *et al.* (9).

Les lignes pâles représentent la transcription et les lignes foncées les interactions protéiques. Les lignes pointillées représentent l'absence d'interaction contrairement aux lignes pleines.

2.8 Théories comportementales du régulon Pho

Comme mentionné précédemment, PhoBR est autorégulé ou autrement dit, il y a une boucle d'auto-amplification lorsque le régulon Pho est activé. De ce phénomène découle la théorie comportementale "d'apprentissage" du TCS PhoBR. En effet, il a été démontré que l'induction du régulon Pho est plus rapide lorsque les bactéries ont préalablement fait face à une carence en phosphate (78). Ce constat s'expliquerait par le fait qu'il y aurait une accumulation de matériel de régulation tel le système Pst sur plusieurs générations, ce qui abaisserait le seuil d'activation du régulon Pho (237). D'un autre côté, à l'intérieur d'une population bactérienne homogène (génétiquement identique), il existe un phénomène hétérogène de bruit de fond. Ainsi, il est possible de distinguer des variations phénotypiques d'une cellule à l'autre (165). C'est notamment le cas pour le régulon Pho où une certaine sous-population peut être induite tandis que le reste des cellules demeurent en état réprimé,

on parle alors de la théorie du comportement ‘stochastique’. Cette dualité à l’intérieur d’une même population confère un avantage de taille au niveau de l’adaptation. En effet, la présence d’une diversité phénotypique favorisera la survie bactérienne par sélection naturelle, et ce face à différents changements environnementaux (180). Par ailleurs, l’effet stochastique est un caractère notable du cross-talk entre partenaires auxiliaires des TCS. En ce sens, PhoB peut être activé stochastiquement par des HK auxiliaires, soit fortement (ArcB, QseC, KdpD et CreC) ou bien seulement lorsque les ÉR partenaires sont absents (BaeS et EnvZ) (237).

2.9 Évolution du régulon Pho

L’évolution parallèle d’un microorganisme et de son hôte détermine les caractéristiques de leur interaction, les gènes de virulence impliqués et les circuits de régulation contrôlant l’expression de ces gènes (31). Grâce au séquençage de génomes entiers du règne bactérien, aux études structurales et biophysiques, il est possible de déterminer comment l’évolution des régulons est influencée en regard des niches écologiques (139, 222). D’une part les TCS eux-mêmes peuvent être modifiés par la spécialisation de certains domaines ou par la perte de fonctions (75). D’ailleurs, il a été démontré qu’une protéine régulatrice transférée dans une autre espèce peut se lier aux sites de fixation qui lui sont spécifiques sans pour autant recruter l’ARNP (152). Dans certains cas, il peut y avoir perte de gènes ou acquisition de nouveaux membres par des transferts horizontaux. Ces gènes acquis s’introduisent généralement à l’intérieur d’un opéron ou en aval d’un ancien membre (139, 153). De plus, la transcription de certains gènes peut être altérée d’une espèce à l’autre par un changement au niveau de la séquence du promoteur (152). Somme toute, l’évolution bactérienne implique nécessairement l’émergence de la complexité des systèmes de régulation. Les 2 prochaines sections ont pour but de mettre en lumière à quel point les déterminants, de virulence ou non, sont hautement spécifiques à chaque souche et ce, même lorsqu’ils font partie d’un système métabolique conservé tel le régulon Pho.

3. Phénotypes associés au régulon Pho chez *E. coli*

3.1 *E. coli* non-pathogène

Chez la souche *E. coli* K-12 non-pathogène, PhoU est impliqué dans le phénomène de persistance. La persistance est la capacité d'une portion de la population à survivre à un traitement aux antibiotiques via un état de quiescence métabolique. En fait, un transposon mini-Tn10 situé dans la région C-terminale de *phoU* mène à une susceptibilité accrue aux antibiotiques tels l'ampicilline, la norfloxacine et la gentamicine. De plus, ce mutant est plus sensible à l'acidité, à la chaleur, au peroxyde d'hydrogène, aux inhibiteurs d'énergie et ce, spécialement en phase stationnaire. Une étude transcriptomique a aussi montré que cette mutation mène à la surexpression des gènes impliqués dans le chimiotactisme, la production d'énergie, et la synthèse des flagelles. Ainsi, au-delà du fait que PhoU soit un régulateur négatif du régulon Pho, il semble être aussi un régulateur négatif de processus métaboliques connexes. Afin de confirmer les résultats, les auteurs ont effectué une délétion *phoU*. Ce mutant présente les mêmes phénotypes de persistance mais, a un retard de croissance et est moins stable. Ce mutant a aussi été comparé à des mutants de délétion *phoB*, *phoR* et *phoBR*. Les résultats indiquent que ni PhoB ni PhoR n'affectent la persistance chez la souche *E. coli* K-12. De ces résultats, les auteurs affirment que les phénotypes observés chez le mutant *phoU* sont indépendants des gènes du régulon Pho. Cependant, leur conclusion est erronée puisqu'ils ne prouvent pas que l'activation du régulon Pho n'est pas responsable de ces phénotypes. Pour être justes, les auteurs auraient dû utiliser une approche de type double mutant tel *phoU/phoB* (110).

3.3 *E. coli* entéro-invasive (EIEC)

Chez la souche *E. coli* entéro-invasives (EIEC) Ec11, l'insertion d'un transposon à l'intérieur de l'opéron *pstSCAB-phoU* résulte en une augmentation du pouvoir d'invasion comme démontré avec des cellules épithéliales HEP-2. Ce phénomène semble être dû à l'activation du régulon Pho puisque le phénotype d'hyper-invasion corrèle avec la production constitutive de PhoA. Fait à noter, le

phénotype d'hyper-invasion n'est pas attribuable à la surproduction de PhoA. De plus, la mutation *pstSCAB-phoU* ne cause pas la surexpression des gènes de l'opéron *ipa*. Ces gènes codent pour des protéines de la membrane externe agissant comme des adhésines/invasines et sont retrouvés sur le plasmide de grande taille VIR. Cependant, d'autres essais ont montré que le phénotype d'hyper-invasion du mutant *pstSCAB-phoU* est supérieur à la somme des phénotypes d'invasion dus à des gènes chromosomaux et plasmidiques. Ainsi, il est fort probable que l'invasion attribuable à l'activation constitutive du régulon Pho résulte en une action synergique de ces deux circuits d'invasion (178).

3.4 *E. coli* entéropathogène (EPEC)

Chez la souche *E. coli* entéropathogène (EPEC) LRT9, l'opéron *pst* est nécessaire à l'expression complète des adhésines EPEC et la délétion de *pst* inhibe l'adhérence bactérienne aux cellules HEp-2. En fait, la transcription de *bfp* et *eae* est réprimée chez un mutant de délétion pour l'ensemble de l'opéron *pst*. *bfp* et *eae* sont responsable pour les phénotypes d'adhérence localisée et intime respectivement. La délétion de *pstSCAB-phoU* réprime aussi *perA* et *perC*, des régulateurs de la transcription de *bfp* et *eae*. Bien que la délétion de l'opéron *pst* chez la souche EPEC LRT9 mène à l'activation constitutive du régulon Pho, ceci n'est pas relié au phénotype d'adhérence puisque un double mutant *pstSCAB-phoU/phoB* montre des taux d'adhérence et d'expression de *bfp* et *eae* tout aussi faibles que le simple mutant. De plus, un mutant ponctuel *phoR(T220N)* Pho-constitutif n'affecte pas l'adhérence de la souche LRT9 (56). Il est possible que la région intergénique entre *pstA* et *pstB* possédant un rôle dans la régulation traductionnelle de *rpoS* soit responsable de ce phénotype. En effet, chez une souche *E. coli* entérohémorragique (EHEC), *rpoS* active l'expression du locus d'effacement des entérocytes (LEE), un îlot de pathogénicité responsable des lésions attachantes/effaçantes, via DsrA (102). En comparaison avec la souche de laboratoire *E. coli* K-12, la région intergénique entre *pstA* et *pstB* de la souche EPEC E2348/69 comporte une délétion de 92 paires de bases. Cependant, la séquence régulant *rpoS* est intacte. Enfin, le fait qu'un mutant

polaire *pstS* montre un taux d'adhérence similaire au mutant *pstSACB-phoU* tandis qu'un mutant non-polaire *pstS* n'affecte pas l'adhérence indique que l'absence de la région intergénique entre *pstA* et *pstB* est possiblement responsable de l'inhibition de l'adhérence bactérienne aux cellules HEp-2 chez la souche EPEC LRT9 (56).

Chez la souche EPEC atypique E128012 (sérotypage O114:H2), les mutants du système Pst sont déficients quant à l'adhésion aux cellules HEp-2 et T84. Ce phénotype a été démontré en étudiant une bibliothèque de mutants par transposon pour rechercher des adhésines alternatives à Bfp qui est absent des souches EPEC atypiques. Les résultats ont ensuite été confirmés par une délétion dirigée de *pstCA*. Puisqu'il n'y a pas de modèle d'infection animal pour les EPEC atypique, la souche *Citrobacter rodentium* ICC169, un pathogène naturel de souris, a été utilisé afin de déterminer si l'opéron Pst contribue à la virulence d'entérobactéries responsables de lésions attachantes/effaçantes. Les résultats des infections simples et des coinfections montrent que les mutants *pstCA* chez *C. rodentium* sont significativement moins aptes à coloniser l'intestin de souris C57BL/6 (absence de diarrhée, absence d'hyperplasie et décompte bactérien). Fait à noter, la délétion de *phoB* chez le mutant *pstCA* abolissait l'expression constitutive du régulon Pho et restaurait le phénotype sauvage des souches EPEC atypique E128012 et *C. rodentium* ICC169. Ceci démontre que l'activation du régulon Pho est responsable de l'atténuation de la virulence chez les souches EPEC atypique E128012 et *C. rodentium* ICC169 probablement en inhibant l'expression d'une adhésine inconnue. Par ailleurs, puisque le phosphate est présent en concentration importante dans l'intestin, il est possible que des stimuli autres que le phosphate, tel que le pH, soient responsables de la régulation de cette adhésine putative via le régulon Pho (28).

3.5 *E. coli* responsable d'infections extra-intestinales (ExPEC)

Chez la souche *E. coli* uropathogène (UPEC) CFT073, une délétion de *phoU* mène à une production de la phosphatase alcaline de manière constitutive mais, n'affecte pas le taux de croissance dans l'urine humaine. Par ailleurs, le gène *phoU* a

été identifié par signature-tagged mutagenesis (STM) comme étant essentiel à la survie à l'intérieur de tractus urinaire murin (11). Néanmoins, dans un modèle d'infection simple murin, le niveau de colonisation du mutant *phoU* équivaut à celui de la souche sauvage CFT073 au niveau du tractus urinaire. D'un autre côté, dans un modèle *in vivo* de coinfection murin, plus sensible que l'infection simple du fait que la variation entre animaux est éliminée, les résultats indiquent que le mutant *phoU* est éliminé par la souche sauvage. La complémentation du mutant *phoU* restaurait le phénotype sauvage *in vivo* (20). Ainsi, il semble que l'expression inappropriée du régulon Pho pourrait être à la source d'un défaut du pouvoir pathogène de la souche CFT073 dans des conditions *in vivo*. Afin de déterminer les effets métaboliques pouvant mener à ce désavantage compétitif, des études à l'aide de la technologie des microarrays phénotypiques (15) et des microarrays transcriptionnels (181) ont été effectuées en comparant la souche sauvage CFT073 et le mutant *phoU*. Cependant, aucun résultat ne permet d'établir de corrélation avec l'atténuation de virulence observée *in vivo*. Du coup, le mécanisme spécifique par lequel PhoU contrôle la virulence chez la souche UPEC CFT073 reste à découvrir. Il est possible que l'activation constitutive du régulon Pho soit responsable de l'atténuation mais, ceci n'a pas été clairement démontré en utilisant un double mutant *phoU/phoB*.

Chez la souche *E. coli* responsables d'infections extra-intestinales (ExPEC) porcines 5131 O115:K"V165":F165, l'insertion d'un transposon à l'intérieur du gène *pstC* a des effets pléiotropiques relativement à sa virulence. Dans un modèle d'infection porcin *in vivo*, le mutant *pstC* était avirulent et rapidement éliminé de la circulation sanguine. De plus, la composition de la surface bactérienne semble être affectée chez le mutant *pstC* puisque l'épaisseur de la membrane est plus petite que celle de la souche sauvage comme démontré par microscopie électronique. Aussi le contenu en carbohydrate retrouvé dans le surnageant est inférieur chez le mutant *pstC*. Par ailleurs, la composition en acides gras et la perméabilité de la membrane sont aussi perturbées chez le mutant *pstC*. L'ensemble de ces résultats corrént avec la surproduction de PhoA, indiquant que l'avirulence chez le mutant *pstC* de la

souche ExPEC porcine 5131 est possiblement due à une modification membranaire occasionnée par l'activation constitutive du régulon Pho (35, 104, 144).

Chez la souche ExPEC aviaire χ 7122 O78:K80, une délétion des gènes *pstCAB* affecte plusieurs traits de virulence. De plus, cette mutation mène à l'activation constitutive du régulon Pho comme rapporté par la surproduction de PhoA dans un milieu riche en phosphate. Dans un modèle d'infection aviaire *in vivo*, le mutant *pstCAB* cause moins de lésions et le nombre de colonies isolées des organes extra-intestinaux est significativement réduit. Les capacités de ce mutant à produire des fimbriae de type 1, de résister aux effets bactéricides du sérum, au choc acide, aux peptides cationiques et au stress oxydatif sont aussi réduites. Par ailleurs, la forme du lipide A hexa-acylé 1-pyrophosphate est moins abondante chez le mutant *pstCAB* comme démontré en utilisant la technique de chromatographie en couche mince (TLC). Ce résultat abonde dans le sens que le régulon Pho est impliqué dans des modifications du lipide A chez le mutant *pstCAB* et ceci a pour effet de perturber la composition de la surface membranaire. Aussi, les données d'une étude transcriptomique ont montré que le gène *lpxT*, codant pour une enzyme qui transfère un groupement phosphaté au lipide A, est réprimé chez le mutant *pstCAB*. En fait, 470 gènes sont différentiellement exprimés lorsque le mutant *pstCAB* est comparé à la souche sauvage χ 7122 dans un milieu riche en phosphate. Au-delà des gènes impliqués dans l'adaptation aux variations en phosphate, des gènes de réponses aux stress sont modulés dont ceux régissant le stress oxydatif, le stress acide et des gènes régulés par RpoS (réponse générale au stress). Ces résultats indiquent que le régulon Pho est important pour le pouvoir pathogène de la souche ExPEC χ 7122 et gouverne une gamme de circuits métaboliques. Cependant, il n'a pas été démontré hors de tout doute que ces résultats sont attribuables à l'activation du régulon Pho puisque qu'aucun double mutant *pst/phoB* n'a été utilisé lors de ces études (34, 103, 105).

4. Conservation du régulon Pho chez divers genres bactériens

4.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Chez le pathogène végétal *Agrobacterium tumefaciens* C58, l'adhérence est augmentée lors d'une carence en phosphate malgré un retard de croissance. En fait, le biofilm est plus dense et couvre plus d'espace pour une même épaisseur. Ces résultats ont été confirmés dans des modèles de culture cellulaire statique et en circulation continue. La concentration de phosphate à laquelle les résultats ont été effectués était inférieure au seuil d'activation du régulon Pho. Ceci suggère que le système régulationnel gouverné par le système à deux composantes PhoBR est impliqué dans la biogenèse de biofilms chez *A. tumefaciens* C58 (36).

4.2 *Bacillus subtilis*

Chez *Bacillus subtilis*, le régulon Pho est contrôlé par 3 TCS : PhoP/PhoR, ResD/ResE et le système de phosphorelais menant à la phosphorylation de SpoOA (193). Les deux premiers systèmes sont des régulateurs positifs contrairement à SpoOA qui lui est un inhibiteur. De manière générale, PhoPR est responsable de l'induction primaire des membres du régulon Pho. PhoP-activé est nécessaire pour l'expression de l'opéron *resABCDE* tandis que ResD est responsable de l'activation de 80% du régulon Pho. Ainsi, il y a une boucle rétrocontrôle positive. De plus, RedD est responsable de la modulation des gènes de respiration anaérobie, la synthèse du cytochrome C et l'hème A (80). Par la suite, lorsque la réponse orchestrée par PhoPR est en fin de boucle (environ 2 heures), Spo0B and Spo0F, entament une cascade de phosphorylation déboulant jusqu'au recrutement de Spo0A. Ainsi, la transcription de *phoPR* est réprimé et par conséquent, celle des membres du régulon Pho (81).

Plus spécifiquement, la cystéine en position 303 de l'histidine kinase est importante dans la stabilisation du complexe PhoP-PhoR lors du phosphotransfert (49). Il a aussi été démontré que la phosphorylation et la dimérisation du domaine N-terminal et la liaison à l'ADN du domaine C-terminal de PhoP chez *B. subtilis* sont des fonctions indépendantes. Ceci est une caractéristique qui le distingue de PhoB

chez *E. coli* (113). Par ailleurs, les promoteurs reconnus par PhoR sont divisés en deux catégories; P(1) et P(2). Les gènes des promoteurs P(1) sont transcrits lorsque le régulon Pho n'est pas activé ou lorsqu'il y a une activité basale. Il s'agit d'une transcription faible utilisée pour la perception et la traduction du signal (159). Dans cette situation, σ^A et σ^E favorisent l'autoinduction de l'opéron *phoPR* (1, 149). Quant aux gènes des promoteurs P(2), ils sont transcrits lorsque les cellules effectuent la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire et lorsqu'il y a carence en phosphate, ces deux phénomènes concordent généralement ensemble.

Quant au système Pst de *B. subtilis*, il possède cinq membres tout comme chez *E. coli* à la différence que *phoU* est absent et qu'il y a deux copies du gène homologues à *pstB* (199). De plus, une distinction majeure versus *E. coli* est que le système Pst de *B. subtilis* n'est pas impliqué dans la régulation négative du régulon Pho (162). Enfin, *B. subtilis* possède une famille d'au moins 4 phosphatases alcalines. Néanmoins, PhoAIV et PhoAIII composent à elles seules 98% de la production des phosphatases alcalines. Leur induction est dépendante des promoteurs P(2) (81).

4.3 *Campylobacter jejuni*

Chez *Campylobacter jejuni*, le TCS PhosS (HK) et PhosR (ÉR) atypique est activé en carence de phosphate. Celui-ci module l'expression de 12 gènes dont le système Pst. PhosR n'est pas autorégulé et reconnaît les boîtes Pho 5'-GTTTCNAAAANGTTTC-3'. De plus, l'homologie entre les orthologues PhoBR d'*E. coli* est faible (226). Aussi, la phosphatase est distincte de PhoA classique tout en étant soumise à la régulation de PhosSR. En fait, la phosphatase de *C. jejuni* est spécifique aux phosphomonoesters, requiert du Ca^{2+} et est optimale à pH 10. Les caractéristiques inhabituelles de PhoA(Cj) la classe donc dans la famille des PhoX, un groupe séparé de phosphatases alcalines Tat-dépendantes (207).

4.4 *Caulobacter crescentus*

Chez *Caulobacter crescentus*, la formation des tiges ("stalk") est régulée par la concentration environnante de phosphate. En effet, l'élongation des tiges est de 30 fois supérieure lorsque les cellules subissent une carence en phosphate. Un mutant Pst dont le régulon Pho est activé constitutivement fait de très longues tiges. Toutefois, lorsque les gènes *pstS/phoB* sont mutés, l'élongation a toujours lieu de la même manière que la souche sauvage dans des conditions riches en phosphate. Dans un milieu pauvre en phosphate, le double mutant *pstS/phoB* synthétise des tiges beaucoup plus petites que le sauvage. Ceci est logique dans le sens que la synthèse des tiges n'est pas sous le contrôle de PhoB, contrairement à leur élongation. De plus l'utilisation du double mutant démontre que PhoB est épistatique à PstS pour ce phénotype et pour l'activation du régulon Pho (69).

4.5 *Corynebacterium glutamicum*

Chez *Corynebacterium glutamicum*, le TCS PhoRS est responsable de l'activation des gènes répondant aux variations en phosphate (98). PhoR est l'ÉR et PhoS est l'HK. PhoRS est soumis au phénomène d'autorégulation. Il a été confirmé que la phosphorylation de PhoR augmente son affinité de liaison à l'ADN. En ordre décroissant, PhoR lie préférentiellement le promoteur de *pstSCAB > phoRS > phoC > ushA > porB > ugpA > pitA > nucH* et *phoH1 > glpQ1*. La séquence 5'-CCTGTGAAaatCCTGTGAA-3' constitue la boîte Pho chez *C. glutamicum* (172). De plus, une analyse a montré que 92 gènes sont modulés soit positivement ou négativement suite à une carence en phosphate (82).

4.6 *Clostridium acetobutylicum*

Chez *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, l'opéron *pst* se compose de *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, et *phoU* et la structure prédite du système Pst est comparable à celle d'*E. coli*. En étudiant la réponse transcriptionnelle, il a été observé que le seuil d'activation en phosphate est de 0,2 mM. Le transcrit dominant est un ARNm de 1,2 kb correspondant à *pstS*. Par ailleurs, les variations d'abondance relative des

différents transcrits à différents pH suggèrent que le pH est aussi un signal contrôlant la régulation de l'expression du système Pst chez *C. acetobutylicum* (58).

4.7 *Clostridium perfringens*

Chez *Clostridium perfringens*, le phosphate inorganique induit la sporulation. En effet, l'absence de phosphate inorganique en phase stationnaire de croissance mène à un phénotype *spo0A*, c'est-à-dire qu'il y a absence des signes précoces de divisions cellulaires. De plus, la CPE (entérotoxine *C. perfringens*) est produite en réponse à la sporulation et est un facteur de virulence grave dans les maladies gastro-intestinales. Le phosphate est le premier signal découvert induisant la sporulation chez *C. perfringens* (156).

4.8 *Cyanobactéries*

Chez les cyanobactéries, le phosphate est habituellement un élément limitant dans leurs différentes niches écologiques. L'analyse par algorithme de 19 génomes de cyanobactéries a démontré une hétérogénéité des régulons Pho. En effet, les gènes impliqués dans l'assimilation du phosphate sont soit dépendants ou indépendants de SphR, la protéine régulatrice, selon les espèces. De plus, des boîtes Pho ont été retrouvées au niveau des promoteurs de gènes associés à des fonctions autres que le phosphate. Enfin, 3 génomes ne possèdent ni *sphR* ni site de reconnaissance (48). La caractérisation de divers écotypes de *Prochlorococcus* a aussi démontré une très forte variabilité au niveau de l'organisation du régulon Pho qui pourrait être corrélée à la biodisponibilité du phosphate d'où la souche provient (125).

4.9 *Mycobacterium smegmatis*

Chez *Mycobacterium smegmatis*, la délétion de *pstSCAB* cause l'expression constitutive des gènes, dont PhoA, contrôlés par le système à deux composantes SenX3-RegX3 (66, 100). En fait, SenX3 agit comme phospho-donneur et phosphatase de l'ÉR RegX3. L'opéron *phnDCE* est aussi sous le contrôle positif de RegX3. Cependant, *phnF* n'est pas affecté par RegX3 et est lui-même un régulateur

négatif de l'opéron *phnDCE* (62). En fait le système Phn serait aussi un système de haute affinité pour le phosphate, or il ne reconnaît pas les phosphonates (63). Chez *M. tuberculosis*, il y a deux systèmes Pst et les deux protéines PstS1 et PstS2 ont été montré comme étant des facteurs de virulence mais, il est plus sécuritaire d'étudier ce système dans une espèce non-pathogène telle *M. smegmatis* qui possède un système équivalent (18, 204). Par ailleurs, les porines MspA et MspC semblent être importantes pour l'acquisition du phosphate puisqu'une délétion de celles-ci entraîne un retard de croissance sévère sur un milieu pauvre en phosphate (225).

4.10 *Myxococcus xanthus*

Chez *Myxococcus xanthus*, plusieurs TCS contrôlent les variations en phosphate; PhoR1P1, PhoR2P2 et PhoR3P3 (26, 140). D'ailleurs, *M. xanthus* se différencie morphologiquement en structure macroscopique multicellulaire ("fruiting bodies") lorsqu'elle subit une carence en phosphate. Chaque cellule végétative est alors appelée myxospore. Par ailleurs, les réserves de phosphate internes semblent inexistantes puisqu'une concentration inférieure à 10 μM a pour effet de doubler le temps de division cellulaire (223). De plus, il existe un quatrième TCS "solitaire", PhoP4. Cet élément régulateur est essentiel pour assurer l'expression des 3 phosphatases, du système Pst et maintenir un niveau de sporulation élevé. Malgré le fait que PhoP4 interagisse avec l'HK PhoR2, les phénotypes observés tendent à démontrer que PhoP4 interagit préférentiellement avec une HK inconnue qui ne se situe pas dans sa région chromosomale proche (155).

4.11 *Salmonella enterica serovar Typhimurium*

Chez *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, le régulon Pho consiste d'au moins 21 gènes dont le TCS PhoBR. Contrairement à *E. coli*, *phoA*, *psiF* et l'opéron *phnC-à-phnP* sont absents. Le locus *psiR* de *S. typhimurium* correspond probablement à l'opéron *pstSCAB-phoU*. Le gène *apeE*, qui code pour une estérase, est aussi connu pour être un membre du régulon Pho. Sa présence chez *S. enterica* serovars Typhi et Paratyphi A, autant que chez *S. enterica* serovar Typhimurium et son absence d'*E.*

coli indique que ApeR pourrait être impliqué dans la virulence (30). Par ailleurs, il existe deux systèmes pour le clivage des phosphonates; le C-P lyase et la phosphonatase. *S. typhimurium* possède 7 gènes (*phnR* à *phnX*) qui correspondent à la voie de la phosphonatase. En comparaison, *E. coli* utilise uniquement la voie de la C-P lyase et *Enterobacter aerogenes* possèdent les deux voies métaboliques (85). Somme toute, le régulon Pho peut être fortement divergent pour des genres bactériens similaires.

4.12 *Serratia sp.*

Chez *Serratia sp.* ATCC 39006, une mutation de *pstS* affecte le quorum sensing et la synthèse de métabolites secondaires. En fait, autant la mutation *pstS* qu'une carence en phosphate induit l'expression de *smalI*, un régulateur du quorum sensing de type LuxIR. De plus, la mutation *pstS* augmente la biosynthèse de la prodigiosine, un pigment de couleur rouge antifongique et antiprotozoaire. Cet effet est indirecte puisqu'il est dépendant de l'activation de *rap*, le régulateur de l'opéron codant pour la biosynthèse de la prodigiosine *pigA-O* (71).

4.13 *Sinorhizobium meliloti*

Chez *Sinorhizobium meliloti*, 31 gènes sont induits et 3 gènes sont réprimés par l'ÉR PhoB lors d'une carence en phosphate. Parmi ceux-ci, certains sont impliqués dans le métabolisme du phosphate dont l'opéron *pstSCAB* (234) tandis que d'autres participent notamment à l'homéostasie du fer ou à la réponse oxydative (*kata*) (235). Dans ce cas, la transcription de *kata* est indépendante du promoteur par lequel OxyR régule *kata* généralement. L'impact phénotypique de cette surexpression de *kata* se traduit par une augmentation de la résistance au peroxyde d'hydrogène, un agent inducteur de stress oxydatif. Cette propriété est aussi partagée avec *P. aeruginosa* et *A. tumefaciens* (233). D'un autre côté, *S. meliloti* synthétise deux types d'exopolysaccharides. Le premier est le succinoglycane (EPS I) et serait régulé indirectement par PhoB (163). Le second est le galactoglucane (EPS II) et est produit en période de carence en phosphate. La régulation transcriptionnelle positive

est le résultat de la liaison coopérative de PhoB et WggR au niveau des promoteurs proximaux des gènes codant pour la synthèse de l'EPS II. Cependant, MucR est un fort inhibiteur de l'expression de ces gènes en se liant au niveau des promoteurs distaux. La synthèse du galactoglucan repose donc sur un modèle de régulation complexe (10). Par ailleurs, PhoB semble impliqué dans la régulation du quorum sensing via l'activation de *sinR* qui activera ensuite l'expression de *sinI* (128).

4.14 *Shigella flexneri*

Chez *Shigella flexneri*, une mutation de l'opéron *pst-phoU* mène à la production constitutive de PhoA. De plus, cette mutation provoque un phénomène d'hyper-invasion lorsque cultivé avec des cellules HEp-2. Les plages de lyse sur une monocouche de cellules de Henle chez le mutant *pst* sont aussi affectées. Or, l'expression du régulon Pho via l'activation constitutive de PhoB pourrait être en cause. Un double mutant *pst/phoB* restaure le phénotype sauvage confirmant que ces phénotypes sont PhoB-dépendants. Il est donc possible que *S. flexneri* lors d'une infection rencontre des conditions de carence en phosphate qui induirait ce trait de virulence augmentant ainsi son pouvoir pathogène (168, 178). Par ailleurs, le séquençage de *phoB* de *S. flexneri* a mis en évidence une mutation en position 172 modifiant ainsi une leucine pour une arginine comparativement à PhoB chez *E. coli*. Cette divergence de PhoB pourrait expliquer en partie l'absence d'expression du gène *phoE* d'*E. coli* lorsque complémenté en trans chez *S. flexneri* (173).

4.15 *Streptomyces coelicolor*

Chez *Streptomyces coelicolor*, la disponibilité du phosphate influence la capacité de produire des antibiotiques et des métabolites secondaires. Le contrôle du régulon Pho dépend du TCS PhoPR, où PhoP est l'ÉR et PhoR est l'HK. La boîte Pho correspond à la séquence 5'-G(G/T)TCAYYYR(G/C)G-3' (183). *S. coelicolor* possède deux transporteurs de faible affinité pour le phosphate, PitH1 et PitH2, en plus du système Pst. PitH1 est sous la gouverne de l'élément régulateur PhoP. Cependant, le promoteur *pitH2* ne possède pas de boîte Pho et ne répond donc pas à

PhoP (170). Par ailleurs, trois gènes codant pour des phosphatases alcalines ont été identifiés; *phoA*, *phoC* et *phoD*. En fait, PhoA et PhoC sont des phosphatases alcalines communes tandis que PhoD s'apparente davantage à la phospholipase D de *Streptomyces chromofuscus*. Par différentes techniques, il a été établi que PhoA et PhoD étaient des membres du régulon Pho contrairement à PhoC (5). Par ailleurs, il a été démontré que PstS est glycosylé. Or, lorsque le gène *ppm1* est muté, *S. coelicolor* acquiert une résistance phagique. Du coup, il a été proposé que la glycosylation de PstS soit nécessaire pour la synthèse du récepteur phagique (219). Au niveau du contrôle de la biosynthèse des antibiotiques actinorhodine et undecylprodigiosine, PhoP compétition avec le régulateur positif AfsR. Autrement dit, PhoP est un régulateur négatif indirect puisqu'il se lie à la région promotrice de l'opéron *afsSR*. Réciproquement, AfsR a aussi la capacité de lier les boîtes Pho ce qui suggère un réglage fin du contrôle des métabolites secondaire chez *S. coelicolor* (171).

4.16 *Streptomyces lividans*

Chez *Streptomyces lividans*, la biosynthèse des métabolites secondaires est fortement réprimée lors d'une carence en phosphate. Ainsi, la production d'actinorhodine et d'undecylprodigiosine est augmentée chez des les mutants *phoP* et *phoPR*. De plus, la phosphatase alcaline n'est plus exprimée chez ces mêmes mutants (182). Ceci concorde avec le rôle de système à deux composantes de PhoPR comme responsable du régulon Pho (64). Par ailleurs, le métabolisme du carbone et du phosphate semblent interconnectés puisque PstS s'accumule dans le milieu extracellulaire en présence de certains sucres. Il a aussi été remarqué qu'une délétion de *pstS* favorise la différenciation et la sporulation chez *S. lividans* (40).

4.17 *Streptomyces natalensis*

Chez *Streptomyces natalensis*, la synthèse de l'antifongique pimarinine dépend de la régulation en réponse au phosphate. En effet, des concentrations de phosphate inorganique inférieures à 10 mM inhibe l'expression des gènes produisant la piramicine dont le régulateur positif *pimR*. Cependant, aucune boîte Pho n'a été

identifiée en amont des gènes *pim*. En parallèle, une délétion du gène codant pour le régulateur PhoP mène à la surexpression des gènes *pimS1*, *pimS4*, *pimC* et *pimG* indiquant que le TCS PhoPR agit indirectement (132).

4.18 *Synechocystis sp.*

Chez *Synechocystis sp.* PCC 6803, le régulon Pho est contrôlé par l'ÉR SphR et l'HK SphS (88). L'analyse par microarray a démontré que 12 gènes étaient fortement induits en réponse à une carence en phosphate dont *phoA*, *pst1*, *pst2* et *nucH* (une nucléase extracellulaire) (197). Par ailleurs, seulement le système Pst1 est impliqué dans la répression du régulon Pho chez les cellules en condition suffisante de phosphate (22).

4.19 *Proteus mirabilis*

Chez *Proteus mirabilis* HI4320, la mutation des gènes du système Pst (*pstS* et *pstA*) mène à l'atténuation dans un modèle d'infection urinaire de souris. Ces mutations entraînent aussi l'activation constitutive du régulon Pho via le TCS PhoBR. La complémentation en trans restaure les phénotypes sauvages. Il a donc été avancé que Pst pouvait être considéré comme un facteur de virulence chez *P. mirabilis* HI4320 (83). Hélas, cette affirmation est erronée selon les postulats moléculaires de Koch établis par Falkow qui stipulent qu'un facteur de virulence se doit d'être absent des souches commensales ce qui n'est manifestement pas le cas pour le système Pst (55).

4.20 *Pseudomonas aureofaciens*

Chez *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2, la mutation des gènes du système Pst (*pstC* et *pstA*) inhibe la formation de biofilm. Ces résultats corrélerent avec l'activation constitutive du régulon Pho puisque l'abolition de ce dernier restaure la formation de biofilm. Aussi, il a été montré que la production de biofilm dépend de la concentration de phosphate dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs, les mutations

pstC et *pstA* affectent l'activité antifongique de la souche *P. aureofaciens* PA147-2 comme démontré *in vitro* contre *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (138).

4.21 *Pseudomonas aeruginosa*

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le système Pst se compose de PstC, PstA, PstB et PhoU. La différence majeure avec *E. coli* est l'absence de la protéine périplasmique PstS. La délétion de l'ensemble de l'opéron mène à l'activation constitutive du régulon Pho contrairement à une délétion unique de *pstC* ou *pstA*. De plus, PstB et PhoU sont essentiels à la répression du régulon Pho (144). Bien que *E. coli* et *P. aeruginosa* appartiennent à des genres différents et que leur contenu en GC diffère, les boîtes Pho sont fortement conservées (177). Il en va de même chez *Pseudomonas putida* (228). Par ailleurs, *P. aeruginosa* est plus virulent dans un milieu pauvre en phosphate dans un modèle de nématodes *Caenorhabditis elegans*. En fait, une rougeur intense apparaît dans ces vers avant la mort attribuable à *P. aeruginosa*. Ceci est le résultat de trois systèmes; PhoB, MvfR-PQS (quorum sensing) et celui de la synthèse de pyoverdine. L'activation de ces trois systèmes produit un complexe PQS+Fe³⁺ coloré responsable du phénotype létal. Chez la souris, PQS+Fe³⁺ est associé à une mortalité causée par l'apoptose des cellules épithéliales intestinales (236).

4.22 *Pseudomonas fluorescens*

Chez *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, les phosphatases PhoX et PhoD sont des membres du régulon Pho. Ces phosphatases sont exportées via le système de sécrétion Tat. De plus, il a été démontré que des mutants pour plusieurs sidérophores influençaient l'activité de ces phosphatases mais, pas au niveau transcriptionnel (137). D'un autre côté, il y a expression du gène *rapA*, qui code pour une c-di-GMP phosphodiesterase, suite à l'activation du régulon Pho. RapA agit en tant qu'inhibiteur indirecte des biofilms. En fait, RapA diminue le niveau intracellulaire de c-di-GMP ce qui diminue la sécrétion de LapA, un facteur d'adhésion essentiel à

la formation des biofilms chez *P. fluorescens* (136). Il s'agit possiblement du même phénomène qu'observé chez *Pseudomonas aureofaciens* (138).

4.23 *Vibrio cholerae*

Chez *Vibrio cholerae*, la délétion de *phoB* mène à l'atténuation de la virulence. Les mutants *phoB* colonisent moins l'intestin de lapin que la souche sauvage de *V. cholerae*. Fait intéressant, l'ajout de phosphate inorganique à l'inoculum restaure partiellement le défaut de colonisation du mutant *phoB*. Ceci laisse croire que le régulon Pho peut être sujet à d'autres signaux environnementaux. (211) L'analyse protéomique du mutant *phoB* a démontré qu'une réponse générale au stress était induite. De plus, une porine appartenant au régulon Pho, similaire à PhoE de *E. coli*, est impliquée au niveau de la colonisation illéale (70). Toutefois, PhoBR n'affecte pas la production de la toxine cholérique (212). Aussi, la phosphatase alcaline PhoA est de nature monomérique et semble être indépendante de PhoBR (115). Par ailleurs, PhoB serait activé tardivement durant l'infection peut-être en réponse à un épuisement du phosphate. En ce sens, PhoB induit l'opéron *acgAB*, qui code pour une enzyme à c-di-GMP, ce qui augmente la motilité de *V. cholerae*. Ce serait donc un moyen de se préparer à quitter l'hôte et à se disséminer dans le milieu environnemental aquatique (160). De plus, PhoB réprime la formation de biofilm. Aussi, la délétion de *phoB* augmente la sensibilité au peroxyde d'hydrogène et diminue la sensibilité à l'acidité et à l'omolarité en comparaison à la souche sauvage et à un mutant *rpoS*. C'est donc dire que l'activation du régulon Pho favorise un mode de vie planctonique chez *V. cholerae* et suggère que PhoB module la réponse aux stress environnementaux indépendamment du régulateur global de la réponse au stress RpoS (192).

4.24 *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le transport actif du phosphate inorganique s'effectue à travers la membrane plasmique. L'acquisition du phosphate est primordiale afin de maintenir une réserve interne suffisante (154). En fait,

l'accumulation de polyphosphates cytoplasmiques sert de "tampon" afin de filtrer les fluctuations transitoires des niveaux de phosphate extracellulaires. Par ailleurs, les gènes répondant à une carence en phosphate n'ont pas tous la même cinétique d'expression. Par exemple, le transporteur de haute affinité pour le phosphate Pho84 (176) est exprimé lors d'une carence transitoire contrairement à Pho5, la principale phosphatase acide qui est exprimée suite à une plus longue carence (203). Par ailleurs, la délétion de *pho80* ou *pho85*, codant pour des régulateurs négatifs, augmente la production de Pho4. En fait, Pho4 est l'activateur transcriptionnel des différents gènes inductibles lorsque *S. cerevisiae* fait face à une carence en phosphate (209).

5. Stratégies alternatives à l'utilisation d'antibiotiques

5.1 Molécules thérapeutiques ciblant les TCS

La résistance bactérienne aux antibiotiques conventionnels est une préoccupation majeure. Ainsi, de nouvelles stratégies sont nécessaires afin de freiner ce phénomène telle l'utilisation de molécules thérapeutiques ciblant les TCS (227). En effet, les TCS sont nécessaires à l'adaptation bactérienne lors de l'infection de l'hôte. De plus, l'absence de ces systèmes des cellules eucaryotes en font des cibles privilégiées. En fait, il existe plusieurs classes d'inhibiteurs de TCS chez les Gram-positif et les Gram-négatif (12, 65, 188-190, 217). La conception des molécules s'effectue en fonction de l'analyse structurale des TCS (187) et ces composés synthétiques sont ensuite validés par des systèmes de criblage à haut débit (51, 68, 146). À elle seule, la génomique structurale a contribué à identifier plus de 30 nouveaux domaines catalytiques en 3 ans (122). Néanmoins, le principal mécanisme demeure l'agrégation des HK via une altération structurale du domaine catalytique en C-terminal. Il est aussi courant d'utiliser une combinaison de plusieurs classes de molécules (65, 190). Les effets peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. De plus, certains composés rendent le pathogène avirulent sans pour autant affecter la croissance bactérienne, en ciblant spécifiquement un circuit régulationnel de virulence (166).

5.2 Vaccins de souches atténués concernant les TCS

La vaccination est soit de nature préventive ou thérapeutique. Les vaccins se divisent en 4 catégories : des agents infectieux inactivés, des agents vivants atténués, des sous-unités d'agents infectieux ou des toxines inactivées. Un exemple de vaccin atténué est celui contre la tuberculose, le *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG). Or, l'efficacité mitigée du vaccin BCG motive les chercheurs à trouver un meilleur candidat. Par ailleurs, il a été démontré qu'une délétion de PhoP, l'ÉR du TCS PhoPR, mène à l'atténuation de la souche *Mycobacterium tuberculosis* (151). Des tests afin de confirmer le pouvoir immunogène et l'efficacité protectrice du vaccin atténué ont donc été effectués avec succès chez des souris, des cochons et des macaques rhésus (123, 210). De plus, la principale préoccupation concernant les vaccins atténués est leur innocuité. À cette fin, des tests de stabilité sont effectués sur de longues périodes autant dans des modèles *in vivo* qu'*in vitro*; la présence de révertants serait un argument dissuasif pour la poursuite des essais. Fait à noter, les souches atténuées sont généralement truffées de mutations diverses afin de prévenir le regain du pouvoir pathogène de la souche sauvage. Aussi, la bactérie atténuée se doit d'être sensible à une gamme d'antibiotiques. Enfin, le vaccin atténué doit avoir été démontré sécuritaire et non-toxique dans un modèle animal avant de poursuivre son développement en phase clinique (24).

5.3 Interférence avec des traits de virulence

Parmi les méthodes alternatives à l'utilisation d'antibiotiques, des avancées prometteuses sont faites au niveau de l'interférence avec certains traits de virulence sans pour autant cibler directement la viabilité bactérienne. Par exemple, l'adhésion et l'invasion peuvent être bloquées en utilisant des analogues aux récepteurs comme dans le cas de l'adhésion par FimH (molécules à base de α -D-mannose) (220). D'ailleurs, des composés naturels tels que les proanthocyanidines présentes dans le jus de canneberge saturer les adhésines bactériennes inhibant ainsi l'adhésion lors d'infections urinaires (79). De plus, certains composés ont été synthétisés de manière à mimer les ligands afin d'arrêter la biogénèse des pilus y étant associés (157). Dans

d'autres cas, il est possible de prévenir la formation de biofilms en appliquant sur les surfaces un polysaccharide capsulaire de groupe II d'*E. coli* à large spectre (205). Certaines stratégies sont aussi basées sur l'aspect compétitif des niches de colonisation lors d'une infection. En effet, il est possible d'administrer volontairement une souche atténuée ou non-pathogène dans l'optique de réduire le nombre de sites disponibles spécifiques à la colonisation de l'espèce à contrer (194). Somme toute, ces thérapies préventives et curatives spécifiques à des facteurs de virulence préviennent potentiellement l'émergence de nouvelles souches multi-résistantes aux antibiotiques (42).

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS – ARTICLE

Title:

Increased Pho Regulon Activation correlates with decreased virulence of avian
pathogenic *Escherichia coli*

Running title:

Effects of Pho regulon activation on APEC virulence

Sera soumis à:

Infection and Immunity

Authors:

Nicolas Bertrand,¹ Sébastien Houle,² Guillaume LeBihan,¹ Édith Poirier,¹ Charles M. Dozois,^{1, 2} and Josée Harel^{1*}

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6,¹ INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7²

*Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) and Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP), Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6. Phone: (450) 773-8521, ext. 8233. Fax: (450) 778-8108.

ABSTRACT

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains are associated with respiratory infections and septicemia in poultry. The Pho regulon is jointly controlled by the two-component regulatory system PhoBR and by the phosphate-specific transport (Pst) system. To determine the specific roles of the PhoBR regulon and the Pst system in the pathogenesis of the APEC O78 strain χ 7122, different *phoBR* and *pst* mutant strains were tested *in vivo* in chickens and *in vitro* for virulence traits. Mutations resulting in constitutive activation of the Pho regulon rendered strains more sensitive than the wild-type to hydrogen peroxide and to the bactericidal effects of rabbit serum. In addition, production of type 1 fimbriae was also impaired in these strains. Using a chicken competitive infection model, all PhoB constitutive mutants were out-competed by the wild-type parent, including strains containing a functional Pst system. Cumulative inactivation of the Pst system and the PhoB regulator resulted in a restoration of virulence. In addition, loss of the PhoB regulator alone did not affect virulence in the chicken infection model. Interestingly, the level of attenuation of the mutant strains correlated directly with the level of activation of the Pho regulon. Overall, results indicate that activation of the Pho regulon rather than phosphate transport by the Pst system plays a major role in the attenuation of APEC.

Key words:

Escherichia coli, virulence, Pho regulon, Two-component system.

INTRODUCTION

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) O78:K80:H9 strain γ 7122 is involved in the development of diseases such as septicemia, perihepatitis, and pericarditis and it belongs to one of the most prevalent serogroups that cause avian colibacillosis (12). In addition, APEC are a subset of extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) and share virulence traits with strains isolated from human cases of neonatal meningitis, urinary tract infections, and septicemia. Thus, APEC strains represent a high risk of zoonotic infection (22) and their virulence gene pool may contribute to emergence of other ExPEC (15).

Bacterial pathogens use specific mechanisms to mediate adaptive responses to the different environments and stresses encountered within the host (32). As a result, this dynamic process leads to adaptation and survival in different niches during infection. Bacteria use two-component regulatory systems (TCRS) to translate environmental stimuli into expression of a highly precise response (34). The PhoBR TCRS present in many bacterial species responds to external phosphate concentrations and controls gene transcription of the Pho regulon (22). The activation signal, phosphate-limiting conditions, promotes the autophosphorylation of the sensor kinase PhoR (31). Then, the phosphoryl group is transferred to its cognate response regulator PhoB (30). In its activated state, PhoB binds to consensus sequences in the upstream regions of Pho-dependent genes, the Pho-boxes, where it regulates transcription through interaction with RNA polymerase associated with σ^{70} (2, 29).

The *pst* operon belongs to the Pho regulon. The Pst system encodes a high affinity ABC-transporter of inorganic phosphate (Pi) which includes a periplasmic Pi binding protein (PstS), two membrane permeases (PstA and PstC), an ATPase (PstB), and PhoU (38, 44). Moreover, the molecular mechanisms that lead to turning off the Pho regulon involve the Pst system. Indeed, most mutations in the Pst system result in constitutive expression of the Pho regulon, regardless of environmental phosphate

concentrations (48). Furthermore, it is well recognized that inactivation of the Pst system, constitutive expression of the Pho regulon and bacterial virulence are linked in diverse bacterial species (28). In APEC strain χ 7122, deletion of the *pstCAB* genes was shown to reduce virulence in a chicken infection model and to affect multiple virulence attributes including production of type 1 fimbriae, resistance to cationic peptides, to the bactericidal effects of rabbit serum, to acid shock and to oxidative stress (9, 26). Transcriptional analyses demonstrated the induction of a general stress response in the *pst* mutant, including increased expression of genes involved in adaptation to acid stress, oxidative stress, and the general stress response (notably RpoS-regulated genes). In addition, genes associated with cell surface composition were modulated (9). As the Pst system contributes to both regulation of the Pho regulon and to high-affinity uptake of Pi, it remains to be determined if the effects of Pst inactivation on APEC virulence are mediated through the PhoBR TCRS or deficiency in phosphate uptake (28).

Hence, the purpose of this investigation was to test the hypothesis that the PhoBR TCRS rather than the Pst system is critical to the virulence of APEC. To that end, a series of mutants in the *pst* and *phoBR* operons of the APEC O78:K80:H9 strain χ 7122 were generated and were tested for expression of the Pho regulon as well as various attributes of virulence. We report here that constitutive activation of the Pho regulon, through the PhoBR TCRS, is responsible for attenuation of APEC virulence. Moreover, the activation level of the Pho regulon correlates with decreased virulence in *E. coli*. In addition, we demonstrate that the PhoB regulator, which is critical for activation of the Pho regulon, is not required for virulence of APEC in the chicken infection model.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, primers, and media.

The *E. coli* strains and plasmids used for this study are listed in Table 1. Primers used for PCR amplifications are listed in Table 2. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C. LB broth is a high-phosphate medium. Low-P_i (LP) broth was used for alkaline phosphatase assays. LP broth is composed of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4 mM MgSO₄, 0.1% yeast extract, 20 mM glucose, and 1 mM methionine. For experimental infections of chickens, beef heart infusion broth and MacConkey-lactose agar plates were used. Antibiotics or supplements were used at the following final concentrations, when required: chloramphenicol (Cm), 12.5 µg/ml; kanamycin (Kan), 50 µg/ml; nalidixic acid (Nal), 40 µg/ml; and 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (XP or BCIP), 40 µg/ml.

Generation of the *phoR(T220N)* mutant by allelic exchange.

Site specific mutagenesis of *phoR* was used to generate a mutant in which the Pho regulon is constitutively active (48). *E. coli* strain DH5α was used for cloning experiments with pGEM®-T. A first PCR fragment was amplified from the wild-type strain χ7122 with primers *phoR*-Fext and *phoR*-Rint (which contain the desired point mutation). A second PCR fragment was amplified from strain χ7122 with primers *phoR*-Rext and *phoR*-Fint (which also contains the desired point mutation). The 2 PCR fragments were used as template to amplify a full *phoR(T220N)* PCR fragment with *phoR*-FSacI and *phoR*-RSacI primers which both contain SacI restriction sites. This final PCR product was ligated into the SacI site of pGEM®-T. This construct was digested with SacI, and the *phoR(T220N)* fragment was ligated to the the SacI site of suicide vector pMEG-375. The resulting construct was transferred to strain χ7213 and was then mobilized in χ7122 by conjugation. Single-crossover integrants of strain χ7122 were selected on LB agar containing appropriate antibiotics (XP, Nal, and Cm). Selection for double-crossover allele replacement was obtained by *sacB* counterselection on LB agar plates without NaCl but containing 5% sucrose (24), XP

and Nal. The mutant strain BER005 was confirmed to contain the desired point mutation *phoR(T220N)* and no other nucleotide changes, as determined by sequencing.

Construction of mutant derivatives of APEC strain χ 7122.

phoB and *pst* knock-out mutants were obtained by homologous recombination using the λ red recombinase method (11). Briefly, the Δ *phoB::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK0389_1 was used to introduce a Δ *phoB* mutation into χ 7122 with *phoB*-Fext and *phoB*-Rext primers, generating strain BER001. The Δ *pstC::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK3705_1 was used to introduce Δ *pstC* mutation into χ 7122 with *pstC*-Fext and *pstC*-Rext primers, generating BER003 strain. Then, BER002 strain was generated by FLP-mediated excision of the kanamycin cassette from BER003 by using plasmid pCP20 (11). To create the Δ *pstC*/ Δ *phoB* double mutant, the Δ *phoB::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK0389_1 was used to introduce the Δ *phoB* mutation into the BER002 background, generating BER004. Mutations were confirmed by PCR and sequencing, using primers flanking the specific gene region. Restoration of the Pst system in the BER002 mutant was achieved by complementation with plasmid pAN92, which contains a functional *pst* operon. This generated strain BER006.

Alkaline phosphatase assay.

Alkaline phosphatase was measured as described previously (4, 26). Briefly, 4 μ g/ml of *p*-nitrophenyl phosphate was added to 500 μ l of mid-log phase (OD₆₀₀ of 0.6) culture cells permeabilized by 50 μ l of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 50 μ l of chloroform. Color development was monitored at 420 nm, and alkaline phosphatase activity was expressed in enzyme units per minute, calculated as follows: $1,000 \times [\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})]/T (\text{min}) \times V (\text{ml}) \times \text{OD}_{600}$.

Sensitivity of *E. coli* strains to hydrogen peroxide.

Sensitivity to hydrogen peroxide induced oxidative stress was determined by an agar overlay diffusion method on LB plates (1.5% agar) as described in (3, 40), with some modifications (9). Overnight cultures grown in LB broth were adjusted to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.5. 100 μ l of each culture was suspended in 4 ml of molten top agar (0.5% agar) and poured over the agar plates. Sterile blank disks were added to the surfaces of the solidified overlays, and 10 μ l of hydrogen peroxide (30%) was spotted onto the disks. The plates were then incubated overnight at 37°C, and following growth, the diameters of inhibition zones were measured.

Serum bactericidal assay.

The serum bactericidal assay was adapted from the method of Taylor and Kroll (45) as described previously (26). Briefly, bacteria were grown overnight in LB broth at 37°C. Bacterial cultures were then resuspended in fresh medium at a 10-fold dilution, incubated at 37°C, and harvested during the mid-log phase (OD_{600} of 0.6). Bacteria were washed at room temperature with gelatin-Veronal-buffered saline pH 7.35 and then resuspended to a concentration of 10^7 CFU/ml. A volume of 0.1 ml of the bacterial suspension was added to 0.9 ml of normal rabbit serum and then incubated at 37°C. Viable cell counts were determined at 0, 1, 2, and 3 h by spreading out dilutions of the suspension on LB agar plates. The survival rate was calculated as the CFU determined at each time point divided by the initial CFU present at time zero.

Yeast cell aggregation assay.

To test the production of type 1 fimbriae, mannose-sensitive yeast agglutination assays were performed. The yeast aggregation assay was derived from a microhemagglutination assay in 96-well round-bottom plates (37) as described previously (9). Briefly, cultures were grown to mid-log phase (OD_{600} of 0.6) in LB broth at 37°C without shaking at 37°C to enhance expression of type 1 fimbriae. Bacterial cells were centrifuged, and pellets were suspended in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) to an initial suspension of approximately 3×10^{10} CFU/ml.

Samples were then serially diluted two-fold in microtiter wells, and equal volumes of a 3% commercial yeast suspension were added to each of the wells. After 1 hour of incubation on ice, yeast aggregation was monitored visually, and the agglutination titer was recorded as the most diluted bacterial sample giving a positive aggregation reaction. The Δfim type 1 fimbriae mutant strain $\chi 7279$ (9) was used as a negative control.

Experimental infection of chickens via the air sacs.

A competitive coinfection model was used as described previously (40), with some modifications. Strains were prepared from a diluted 24-h beef heart infusion broth culture and equal quantities (5×10^6 CFU) of each mutant strain and a virulent $\Delta lacZYA$ derivative of strain $\chi 7122$, strain QT51, were used as the 100 μ l inoculum. Use of QT51 in coinfections permitted a direct evaluation of the number of colonies of QT51 (Lac⁻ colonies) compared to the isogenic mutants (Lac⁺ colonies) on each plate. All birds were euthanized at 48 h postinfection and were then necropsied. Organs were removed aseptically. Blood samples, the left lung, liver, and spleen of each animal were weighed, suspended in phosphate-buffered saline, and homogenized. Dilutions of homogenates were plated onto MacConkey-lactose agar plates with appropriate antibiotics for bacterial quantification. Several randomly selected colonies per organ were verified by PCR. The competitive index (CI) was calculated as the CFU/g of the mutant strain divided by the CFU/g of strain QT51 in the in each tissue or blood sample divided by the same ratio in the initial input inoculum.

Statistical analyses.

Statistical analyses were performed using the Prism 4.03 software package (GraphPad Software). Paired one-tailed Student's T-test was used to determine significant differences for alkaline phosphatase activity, sensitivity to hydrogen peroxide and yeast cell aggregation assays. Analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was used for the serum assays. For the coinfection experiments,

geometric means of the CIs were determined and a Student's T-test (two-tailed) was used to determine whether the logarithmically transformed ratios differed significantly from 0 (13). P values below 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

To distinguish between the specific contributions of the PhoBR TCRS and the Pst system for APEC virulence, we used a series of *pst* and *phoBR* mutant derivatives of APEC O78 strain χ 7122 (Table 1). Both Δ *pstCAB* and Δ *pstC* mutants were complemented with the plasmid pAN92, containing a functional *pst* operon, restoring wild-type alkaline phosphatase (AP) activities. However, we were unable to restore a wild-type phenotype in the *phoR(T220N)* mutant, that demonstrates constitutive expression of the Pho regulon, by introducing a *phoBR*-carrying plasmid. This is likely due to dominance of the *phoR(T220N)* over the wild-type copy of the *phoR* gene. The growth kinetics of the mutants and complemented strains under low or high concentrations of phosphate were similar to that of wild-type strain (data not shown).

To determine the activation status of the Pho regulon in our mutants, the AP activities of strains were measured under phosphate-limiting and high-phosphate conditions (Table 3). The AP encoded by *phoA*, a member of the Pho regulon, is widely used as an indicator to monitor the level of expression of the Pho regulon (7, 16, 19, 26). In high-phosphate conditions, the wild-type strain demonstrated a minimal base line of AP production. On the other hand, Δ *pstCAB*, Δ *pstC* and *phoR(T220N)* mutants produced AP constitutively ($P < 0.05$) compared to wild-type parent strain χ 7122 (Table 3). Among the constitutive AP producing mutants, there was a stronger induction of the Pho regulon in the Δ *pstCAB* mutant ($P < 0.05$) (Table 3). In low-phosphate medium, the AP production of the wild-type strain was activated, although the AP activities of Δ *pstCAB* and Δ *pstC* mutants were higher than the wild-type

strain ($P < 0.05$). AP production in the $\Delta pstCAB$ mutant was markedly elevated compared to all other strains ($P < 0.05$) when grown in low-phosphate medium. By contrast, the AP activity of the $phoR(T220N)$ mutant was similar to that of the wild-type strain. In the $\Delta phoB$ and $\Delta pstC/\Delta phoB$ mutants, no AP activity was observed in either high-phosphate or low-phosphate conditions, indicating that the Pho regulon is inactivated in these strains. Consequently, the activation of the Pho regulon in the $\Delta pstC$ mutant is therefore *phoB*-dependent. Taken together, results demonstrate that there are different degrees of Pho regulon activation due to introduction of the different *pst*- and *pho*-specific mutations.

Virulence determinants.

To determine whether the Pst system and the Pho regulon contribute to resistance to serum, we tested the ability of the strains to survive in 90% rabbit serum (Figure 1). The wild-type $\chi 7122$ strain multiplied in serum, and was considered serum resistant. The $\Delta pstCAB$ was rapidly killed by rabbit serum and was significantly more sensitive to serum than all other strains at each time point ($P < 0.05$). The bacterial counts of $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ mutants showed a significant decrease compared to the wild-type strain after 2 and 3 hours ($P < 0.05$). In addition, $\Delta phoB$, $\Delta pstC/\Delta phoB$ and complemented strains were as resistant to serum as parent strain $\chi 7122$. The serum-sensitive control strain 862 did not survive after 1 h of exposure to 90% rabbit serum (data not shown).

To assess the effects of a *pst* mutation as well as Pho regulon activation on APEC strain $\chi 7122$ for production of type 1 fimbriae, we used a yeast cell agglutination assay (Figure 2). Yeast cells are rich in mannose surface molecules, which are recognized by the type 1 fimbrial adhesin. The $\Delta pstCAB$ strain did not produce agglutination at the highest bacterial titer ($P < 0.05$). The minimal bacterial titer allowing yeast agglutination was higher for the $phoR(T220N)$ and $\Delta pstC$ mutants than the wild-type strain ($P < 0.05$). On the other hand, no differences were observed with

the $\Delta phoB$ and $\Delta phoB/\Delta pstC$ mutants, which agglutinated at titres comparable to the wild-type parent. Complementation of the $\Delta pstCAB$ and $\Delta pstC$ mutants restored yeast agglutination titers to wild-type levels, which corresponds to a regain in production of type 1 fimbriae. The $\chi 7122 \Delta fim$ ($\chi 7279$) strain was used as a negative control and did not show agglutination of yeast cells (data not shown).

To investigate the role of the Pst system and the Pho regulon in sensitivity to hydrogen peroxide, we used the H_2O_2 agar overlay diffusion method (Table 4). Diameters of inhibition zones were significantly larger with $\Delta pstCAB$, $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ mutants compared to the parent strain $\chi 7122$ ($P < 0.05$). The PhoR mutant demonstrated a lower diameter of sensitivity, suggesting that this strain was slightly more resistant to hydrogen peroxide than the other Pho constitutive mutants, although this difference was not statistically significant. Complementation of the $\Delta pstCAB$ and $\Delta pstC$ mutants restored the wild-type phenotype. On the other hand, there was no difference in measurements of inhibition zones in response to H_2O_2 with $\Delta phoB$ and $\Delta pstC/\Delta phoB$ mutants when compared to wild-type parent strain $\chi 7122$.

Competitive coinfection model for APEC virulence.

To investigate the importance of a *pst* mutation as well as Pho regulon activation for the virulence of APEC, we used a competitive coinfection model (Figure 3). In experimental coinfections of chickens, the bacterial counts isolated from blood samples, lung, spleen and liver were significantly reduced for $\Delta pstCAB$, $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ mutants ($P < 0.05$) 48 h post-infection. However, regarding the $phoR(T220N)$ mutant, there was a less marked decrease in CI of liver (0.044) and blood (0.066) compared to both $\Delta pstCAB$ and $\Delta pstC$ mutants. On the other hand, the wild-type strain QT51 significantly out-competed ($P < 0.05$) the $\Delta pstC/\Delta phoB$ mutant in lung, blood and spleen but not in liver. Nevertheless, the means of the CI of the double $\Delta pstC/\Delta phoB$ mutant in lung (0.0344), blood (0.327) and spleen (0.577) were considerably higher than those of the $\Delta pstCAB$, $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ mutants

(Figure 3 BCD). In contrast, the $\Delta phoB$ mutant was as virulent as the wild-type strain in all tissues and blood.

DISCUSSION

In *E. coli* and many other bacterial species, the Pho regulon is activated when cells face phosphate limitation, whereas its expression is inhibited when phosphate levels are replete. The Pho regulon is an important part of a complex network that encompasses not only phosphate homeostasis, but also adaptive responses to stress and altered regulation of a diversity of genes including virulence factors (5, 9, 19, 26). In our study we dissected the specific contribution of both PhoBR two-component regulatory and Pst systems in virulence of an APEC O78 strain.

Taken together, our results indicate that constitutive Pho regulon activity, through the PhoBR TCRS, is largely responsible for APEC attenuation. This statement is based on the fact that all Pho constitutive mutants were affected in every *in vivo* and *in vitro* assay. However, expression of a functional Pst system during Pho activation may provide an *in vivo* advantage, as seen in the *phoR(T220N)* mutant compared to the combined loss of Pst and resulting consequences of constitutive activation of the Pho regulon (i.e. $\Delta pstCAB$ and $\Delta pstC$ mutants). Our findings are in conformity with previous observations. For example, a recent study reported that Pst contributes to the virulence of atypical Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and *Citrobacter rodentium*, through the response regulator PhoB (7). Indeed, they showed that adherence attenuation phenotypes in *pst* mutants were restored by deleting *phoB*. Thus, the impaired adherence in the EPEC or *C. rodentium pst* mutants could be due to a decreased expression of an as yet unidentified Pho-regulated adhesin in these pathogens. Also, a polar *pstS* insertion mutation leads to smaller plaques formation in eukaryotic cell (Henle) monolayers than does the parental strain *Shigella flexneri*. Suppression of the plaque defect in the *pstS* mutant was achieved by a *phoB*

mutation suggesting that the small plaque phenotype was *phoB*-dependant (39). On the other hand, recently, the Pst system was reported to affect adherence of EPEC independently of the Pho regulon in another report (13). In this study, deletion of the *pst* operon in an EPEC strain diminished the expression of the EPEC adhesins, Bfp and intimin, and reduced adherence to epithelial cells. This decrease in adherence was shown to be independent of Pho regulon activation (16). There are major differences between this study on EPEC and results we obtained with APEC strain χ 7122. For the EPEC strain, a Δ *pstC*/ Δ *phoB* double mutant still displayed reduced levels of adherence. Further, a *phoR*(T220N) Pho constitutive EPEC mutant, where the Pst system was functional, adhered to cells as well as the EPEC parent strain (13). By contrast, a *phoR*(T220N) mutant of APEC χ 7122 strain was attenuated, whereas a Δ *pstC*/ Δ *phoB* double mutant regained virulence attributes. Accordingly, in our study *phoB* is epistatic to *pst* in terms of the Pho constitutive phenotype and attenuation of virulence attributes. Taken together, our results indicate that constitutive activation of the Pho regulon rather than loss of phosphate transport mediated by the Pst system is predominantly responsible for the attenuation of APEC χ 7122. However, deletion of *phoB*, and hence inactivation of the Pho regulon, did not alter APEC virulence, since the Δ *phoB* mutant retained virulence and demonstrated virulence phenotypes comparable to the wild-type strain in all *in vitro*. Interestingly, this is in contrast to *Vibrio cholerae* O1, for which a *phoB* null mutant was less able to colonize adult rabbit ligated ileal loops in a competitive model, probably because many genes known to be involved in virulence were down-regulated (46, 47). These contrasting results between different bacterial pathogens emphasize the varying effects that alteration in the regulatory control of the Pho regulon may have on virulence.

The virulence phenotype in APEC χ 7122 is dependent on the activation level of the Pho regulon.

We demonstrate for the first time to our knowledge that the degree of attenuation in *E. coli* correlated with increased activity of the Pho regulon. In fact, increases in AP activity (Table 3) correlated with decreased virulence or competitive fitness in chickens, differences in sensitivity to hydrogen peroxide and serum and yeast agglutination (Table 4, Figure 1 and 2 respectively). In particular, Pho regulon induction levels serum sensitivity and decreased yeast agglutination. The Δ *pstCAB* mutant was more affected than both Δ *pstC* and *phoR(T220N)* mutants in those assays. Furthermore, the Pho regulon activation levels was stronger in the Δ *pstCAB* mutant than in both Δ *pstC* and *phoR(T220N)* mutants in low- and high-phosphate conditions. As demonstrated by the AP activity, the *phoR(T220N)* mutant was defective in PhoR inhibitory activity (its phosphatase activity) but not in its ability to activate PhoB. Indeed, the *phoR(T220N)* mutation is known to confer a modest level of constitutive Pho activity (48, 51) since the point mutation is located within the DHp domain (6). This may explain why the Δ *pstC* mutant demonstrated greater AP activity than the *phoR(T220N)* mutant in low-phosphate medium. On the other hand, AP activity differences between Δ *pstCAB* and Δ *pstC* mutants could be due to the fact that the Δ *pstCAB* lacks a functional PstA permease and PstB ATPase in addition to loss of the PstC permease. Indeed, it was suggested that PstB is important for inhibition of the Pho regulon by acting in concert with PhoU (49). It is also possible that differences between Δ *pstCAB* and Δ *pstC* strains may be due to loss of an intergenic region 3' of *pstA* in the Δ *pstCAB* mutant. Recently, this region was suggested to stimulate translation of *rpoS* (41), and RpoS is known to inhibit the expression of genes that are transcribed by RNA polymerase σ^{70} such as genes belonging to the Pho regulon (42). Overall, it is likely that a stronger induction of the Pho regulon leads to a higher expression of genes associated directly or indirectly with virulence.

Our results demonstrated that the resistance to serum is impaired when the Pho regulon is constitutively active and that sensitivity to serum is relative to the level of Pho regulon activity. Indeed, the $\Delta pstCAB$ mutant was significantly different from all strains at each time points while *phoR(T220N)* and $\Delta pstC$ mutants were significantly different from the wild-type strain at 2 and 3 hours (Figure 1). This is significant, since there is a correlation between resistance to the bactericidal effects of serum and the capacity of APEC strains to cause septicemia and mortality (25, 33). Resistance to the bactericidal effect of complement is a multifactorial phenomenon. It is recognized that resistance to serum can correlate with the expression of specific capsular K antigens in combination with O polysaccharides (18, 35, 50). In fact, an O78-negative LPS mutant of strain $\chi 7122$ became serum-sensitive and was unable to persist in body fluids and internal organs of infected chickens (33). Our previous work also reported that the Pho regulon is involved in modifications of the lipid A as a major decrease (66%) of the 1-pyrophosphate lipid A species is observed in *pst* mutants (27). Perhaps, the Pho regulon may participate to the increased sensitivity of mutants to the bactericidal effects of serum by contributing to bacterial surface perturbations (26).

A decrease in the production of type 1 fimbriae also correlated with the level of activation of the Pho regulon given that the $\Delta pstCAB$ mutant did not agglutinate yeast cells while the level of agglutination activity of *phoR(T220N)* and $\Delta pstC$ mutants was reduced when compared to that of the wild-type parent strain (Figure 2). Our previous work has also shown that genes involved in type 1 fimbrial biosynthesis were down-regulated in a $\chi 7122$ APEC *pst* mutant (9). Additionally, type 1 fimbriae are expressed in the primary site of initial respiratory infection, namely the air sacs of poultry (14, 36). Therefore, a decreased production of type 1 fimbriae in Pho activated mutants may contribute to reduced APEC colonisation and virulence.

Sensitivity to oxidative stress following exposure to hydrogen peroxide also correlated with increased levels of constitutive AP activity. However, no notable difference was observed between the different mutants where the Pho regulon is activated. This was probably due to the low sensitivity of the technique (Table 4). The ability to resist to reactive oxygen species (ROS) is crucial for full virulence when pathogens face oxidative stress during infection of the host (9, 21). Differential expression data of genes involved in oxidative stress observed in a Pst mutant indicated that the mutant is subjected to increased oxidative stress during growth, and is likely less able to cope with additional stresses incurred from exogenous ROI-generating compounds (43).

Constitutive Pho activity results in reduced virulence in chickens.

By using an avian experimental coinfection model, we demonstrated that activation of the Pho regulon of χ 7122 leads to attenuation of virulence, since the $\Delta pstCAB$, $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ mutants were all outcompeted in the chicken by the wild-type strain (Figure 3). These results indicate that during systemic infection, the Pho constitutive phenotype represents a selective disadvantage in regard to immune defences, nutritional limitations, and other environmental stresses encountered within the host.

Taken together, our results confirm that the PhoB-mediated constitutive activity of the Pho regulon plays a major role in attenuation of APEC virulence and associated traits. By contrast, the Pi transport function of the Pst-system was shown to play a limited role in virulence since the Pst system is not expressed in a virulent PhoB mutant and the Pst system is also fully functional in the $phoR(T220N)$ attenuated mutant, which demonstrated increased constitutive activity of the Pho regulon. Results also further emphasize the fact that PhoB has a dual function as a response regulator for phosphate homeostasis and as a modulator of virulence attributes. There is a clear need for novel approaches to prevent and control bacterial infections including avian colibacillosis. Suitable attenuated vaccines should be

sufficiently invasive and persistent to induce protective immunity and minimize susceptibility to natural infection (17). Interestingly, as the degree of attenuation in the APEC mutants described herein varied according to the degree of constitutive activation of the Pho regulon, this could be useful in the design of new attenuated vaccine strains.

Acknowledgements:

We thank Sébastien Crépin (INRS-IAF) for technical aid during infection experiments. Also, we are grateful to Martin Lamarche (INRS-IAF) for his technical advice during this study. Nicolas Bertrand was supported by FQRNT and by CRIP (FQRNT Regroupements stratégiques 111946). This work was supported by grants to Josée Harel (NSERC RGPIN-25120) and to Charles M. Dozois (NSERC RGPIN 250129-07 and a Canada Research Chair).

References:

1. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0008.
2. **Blanco, A. G., M. Sola, F. X. Gomis-Ruth, and M. Coll.** 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure* **10**:701-713.
3. **Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**:6032-6042.
4. **Brickman, E., and J. Beckwith.** 1975. Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and phi80 transducing phages. *J Mol Biol* **96**:307-316.
5. **Buckles, E. L., X. Wang, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, and M. S. Sonnenberg.** 2006. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic

- Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. Microbiology **152**:153-160.
6. **Carmany, D. O., K. Hollingsworth, and W. R. McCleary.** 2003. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. J Bacteriol **185**:1112-1115.
 7. **Cheng, C., S. M. Tennant, K. I. Azzopardi, V. Bennett-Wood, E. L. Hartland, R. M. Robins-Browne, and M. Tauschek.** 2009. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. Infect Immun **77**:1936-1944.
 8. **Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene **158**:9-14.
 9. **Crepin, S., M. G. Lamarche, P. Garneau, J. Seguin, J. Proulx, C. M. Dozois, and J. Harel.** 2008. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. BMC Genomics **9**:568.
 10. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. Infect Immun **63**:4924-4927.
 11. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:6640-6645.
 12. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res **30**:299-316.
 13. **Dieye, Y., K. Ameiss, M. Mellata, and R. Curtiss, 3rd.** 2009. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. BMC Microbiol **9**:3.
 14. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1

- (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **38**:231-239.
15. **Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl Environ Microbiol* **75**:184-192.
 16. **Ferreira, G. M., and B. Spira.** 2008. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. *Microbiology* **154**:2025-2036.
 17. **Frey, J.** 2007. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* **25**:5598-5605.
 18. **Goldman, R. C., K. Joiner, and L. Leive.** 1984. Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. *J Bacteriol* **159**:877-882.
 19. **Jacobsen, S. M., M. C. Lane, J. M. Harro, M. E. Shirtliff, and H. L. Mobley.** 2008. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**:180-193.
 20. **Jans, D. A., A. L. Fimmel, L. Langman, L. B. James, J. A. Downie, A. E. Senior, G. R. Ash, F. Gibson, and G. B. Cox.** 1983. Mutations in the *uncE* gene affecting assembly of the c-subunit of the adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochem J* **211**:717-726.
 21. **Johnson, J. R., C. Clabots, and H. Rosen.** 2006. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator *oxyR* on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **74**:461-468.
 22. **Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, K. S. Kim, L. Spanjaard, and L. K. Nolan.** 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human

- and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* **74**:7043-7050.
23. **Kaniga, K., M. S. Compton, R. Curtiss, 3rd, and P. Sundaram.** 1998. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**:5599-5606.
 24. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.
 25. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**:27-35.
 26. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* **73**:4138-4145.
 27. **Lamarche, M. G., S. H. Kim, S. Crepin, M. Mourez, N. Bertrand, R. E. Bishop, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2008. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. *J Bacteriol* **190**:5256-5264.
 28. **Lamarche, M. G., B. L. Wanner, S. Crepin, and J. Harel.** 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**:461-473.
 29. **Makino, K., M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, and M. Suzuki.** 1996. DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* **259**:15-26.
 30. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata.** 1986. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **190**:37-44.

31. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata.** 1986. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **192**:549-556.
32. **Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**:1-7.
33. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**:536-540.
34. **Mitrophanov, A. Y., and E. A. Groisman.** 2008. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**:2601-2611.
35. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**:5048-5056.
36. **Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**:331-341.
37. **Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun* **60**:4460-4467.
38. **Rao, N. N., and A. Torriani.** 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**:1083-1090.
39. **Runyen-Janecky, L. J., A. M. Boyle, A. Kizzee, L. Liefer, and S. M. Payne.** 2005. Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **73**:1404-1410.
40. **Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd, and C. M. Dozois.** 2008. Contribution

- of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun* **76**:601-611.
41. **Schurdell, M. S., G. M. Woodbury, and W. R. McCleary.** 2007. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J Bacteriol* **189**:1150-1153.
 42. **Spira, B., and T. Ferenci.** 2008. Alkaline phosphatase as a reporter of sigma(S) levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strains. *Arch Microbiol* **189**:43-47.
 43. **Storz, G., and J. A. Imlay.** 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**:188-194.
 44. **Surin, B. P., H. Rosenberg, and G. B. Cox.** 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J Bacteriol* **161**:189-198.
 45. **Taylor, P. W., and H. P. Kroll.** 1983. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infect Immun* **39**:122-131.
 46. **von Kruger, W. M., S. Humphreys, and J. M. Ketley.** 1999. A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* **145**:2463-2475.
 47. **von Kruger, W. M., L. M. Lery, M. R. Soares, F. S. de Neves-Manta, C. M. Batista e Silva, A. G. Neves-Ferreira, J. Perales, and P. M. Bisch.** 2006. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* **6**:1495-1511.
 48. **Wanner, B. L.** 1986. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, p. 1357-1381. *In* R. C. I. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbrager (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. Washington, D.C.

49. **Wanner, B. L.** 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 104-128. In a. S. Silver, W. William (ed.), Metal ions in gene regulation. Springer, New York.
50. **Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **31**:1307-1319.
51. **Yamada, M., K. Makino, M. Amemura, H. Shinagawa, and A. Nakata.** 1989. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. J Bacteriol **171**:5601-5606.

Figures and tables:

Table 1: Strains and plasmids used in this study.

Strains	Relevant characteristics	References or sources
DH5 α	F ⁻ λ ⁻ Φ 80 $\Delta(lacZYA-argF)$ <i>endA1 recA1</i>	
JWK0389_1	<i>hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JWK3705_1	K12 Δ <i>phoB::kan</i>	(1)
χ 7122	K12 Δ <i>pstC::kan</i>	(1)
BER001	APEC O78:K80:H9 <i>gyrA</i> Nal ^r	(37)
BER002	χ 7122 Δ <i>phoB::kan</i>	This work
BER003	χ 7122 Δ <i>pstC::FRT</i>	This work
BER004	χ 7122 Δ <i>pstC::kan</i>	This work
BER005	χ 7122 Δ <i>phoB::kan/pstC::FRT</i>	This work
K3	χ 7122 <i>phoR(T220N)</i>	This work
CK3	χ 7122 Δ <i>pstCAB::kan</i>	(26)
BER006	K3 + pAN92	(26)
MGN-617	χ 7122 Δ <i>pstC::FRT</i> + pAN92	This work
χ 7279	SM10 λ <i>pir</i> derivative, <i>thi thr leu tonA lacY supE pir</i>	(23)
862	<i>recA::RP4-2-Tc::Mu (Kan^r) ΔasdA1</i>	(9)
	χ 7122 Δ <i>fim</i>	(10)
	ExPEC O115:K ⁻ serum sensitive	
Plasmids		
pMEG-375	<i>sacRB mobRP4 oriR6K</i> Cm ^r Ap ^r	S. Tinge, Megan Health
pCP20	<i>FLP⁺ λ cl857⁺ λ p_RRep^{IS}</i> Ap ^r Cm ^r	(8)
pKM200	<i>Ptac-gam-bet-exo</i> operon from pTP806	Kenan Murphy
pGEM®-T	pGEMR-5Zf(+) Vector with EcoRV at base 51 and adding a T to both 3'-ends	Promega
pAN92	pACYC184:: <i>pst</i> operon Cm ^r	(20)

Table 2: Primers used for PCR amplifications.

Primers	Sequences
phoR-Fext	5'-GTGCGCGGTACAGGATATCGTTTTTCAACC-3'
phoR-Rint	5'-AGGTAACCCTGTAACACGTTCAATGGCGTAC-3'
phoR-Rext	5'-CAGTCAGTATGACAGCACCTGAAGCGCAAT-3'
phoR-Fint	5'-CGTACGCCATTGAACGTGTTACAGGGTTACC-3'
phoR-FSacl	5'-GAGCTCGGAATTTATTGCGCCTTTCATGG-3'
phoR-RSacl	5'-CTCGAGTCAGGCGACTTTCGTGATGATTC-3'
phoB-Fext	5'-ACCTGAAGATATGTGCGACGAGCTT-3'
phoB-Rext	5'-CGTTCACAGCACGTAAGATACTCCAG-3'
pstC-Fext	5'-CAGAACAAGGCACAGAAGTGCTGA-3'
pstC-Rext	5'-GGGTAGCGGGCTGTTAATTTTGTG-3'

Table 3: Alkaline phosphatase activities of χ 7122, isogenic mutants and complemented strains in high (LB) or low (LP) phosphate medium.

Strain	Alkaline phosphatase activity (arbitrary units \pm SD)	
	LB	LP
χ 7122	2,4 \pm 1,2	82,6 \pm 6,4
Δ <i>pstCAB</i>	134,7 \pm 26,8 *	180,2 \pm 9,6 *
Δ <i>pstC</i>	33,8 \pm 5,3	119,6 \pm 11,1
<i>phoR(T220N)</i>	19,3 \pm 3,5	70,7 \pm 5,8
Δ <i>phoB</i>	1,4 \pm 2,2	1,9 \pm 2,1
Δ <i>pstC</i> / Δ <i>phoB</i>	3,1 \pm 2,1	2,8 \pm 1,3
CK3	2,7 \pm 1,5	75,7 \pm 12,1
Δ <i>pstC</i> + pAN92	4,2 \pm 3,5	76,3 \pm 11,8

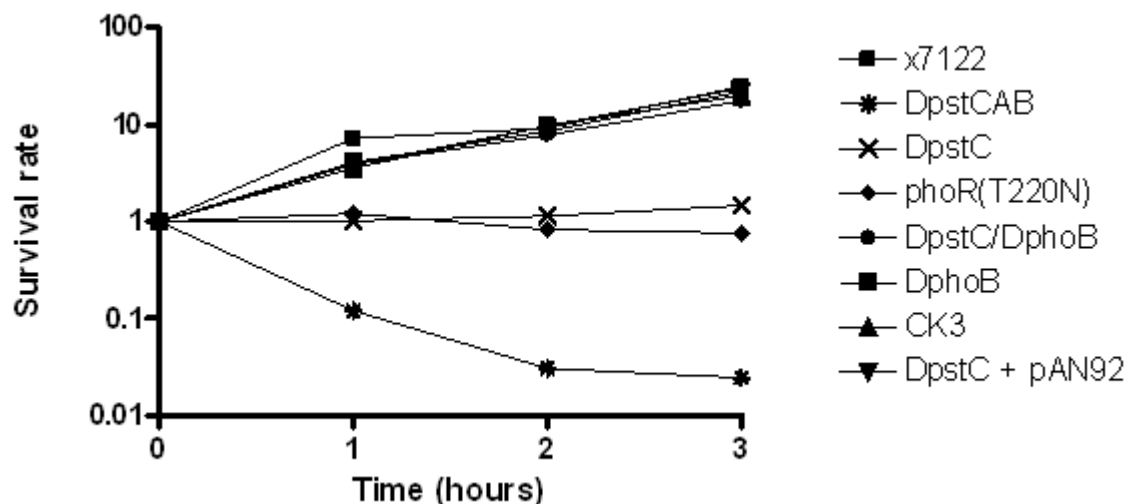
Data presented are the means \pm the standard deviations of three independent experiments. Negative alkaline phosphatase activity values were reported as 0. Values indicated in bold text are significantly different ($P < 0.05$) compared to the mean of the wild-type strain as calculated by Student's T-test. Values marked with asterisks are significantly different ($P < 0.05$) compared to the mean of every other strains as calculated by Student's T-test. Strains tested were wild-type APEC strain χ 7122, Δ *pstCAB* (K3), Δ *pstC* (BER002), *phoR(T220N)* (BER005), Δ *phoB* (BER001), Δ *pstC*/ Δ *phoB* (BER004), CK3 (K3 + pAN92) and Δ *pstC* + pAN92 (BER006).

Table 4: Growth inhibition zone of APEC χ 7122, isogenic mutants and complemented strains to hydrogen peroxide.

Strain	Growth inhibition zone (mm)
χ 7122	17,7 \pm 0,6
Δ pstCAB	21,3 \pm 0,6
Δ pstC	21,0 \pm 0,5
phoR(T220N)	20,1 \pm 0,4
Δ phoB	18,3 \pm 0,6
Δ pstC/ Δ phoB	18,6 \pm 0,5
CK3	18,7 \pm 0,6
Δ pstC + pAN92	18,4 \pm 0,6

Data presented are the means \pm the standard deviations of six independent experiments. Compound used was 10 μ l of H₂O₂ (30% vol/vol) on LB agar plates. Values indicated in bold text are significantly different ($P < 0.05$) compared to the mean of the wild-type strain as calculated by Student's T-test. Strains tested were wild-type APEC strain χ 7122, Δ pstCAB (K3), Δ pstC (BER002), phoR(T220N) (BER005), Δ phoB (BER001), Δ pstC/ Δ phoB (BER004), CK3 (K3 + pAN92) and Δ pstC + pAN92 (BER006).

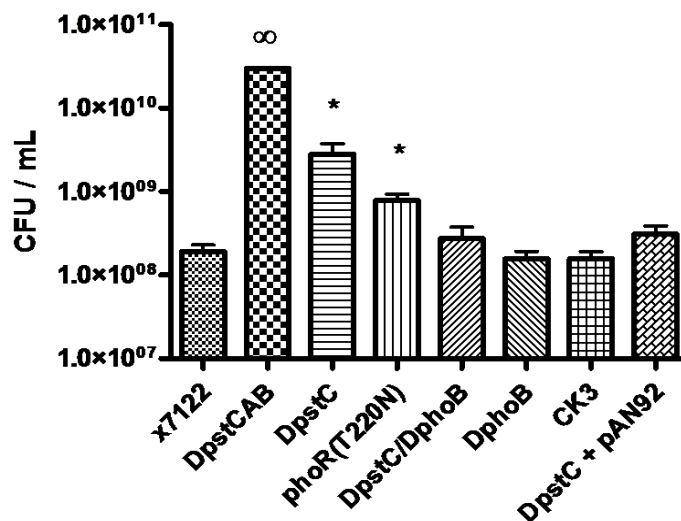
Figure 1. Bacterial resistance to serum of APEC χ 7122, isogenic mutants and complemented strains.



Data presented are the means of three independent experiments. The survival rates were measured in 90% rabbit serum for various periods of time. Strains tested were wild-type APEC strain χ 7122, Δ pstCAB (K3), Δ pstC (BER002), phoR(T220N)

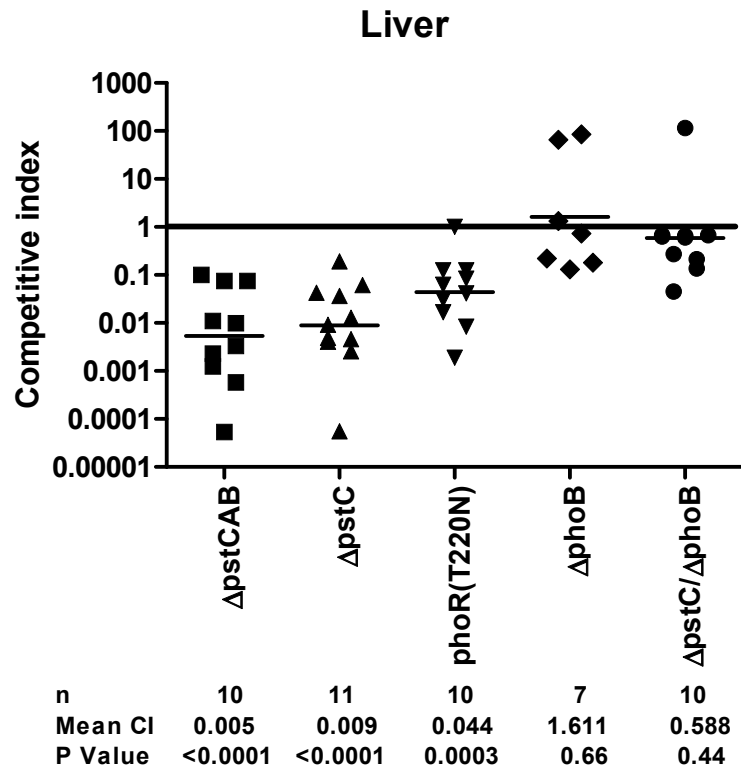
(BER005), $\Delta phoB$ (BER001), $\Delta pstC/\Delta phoB$ (BER004), CK3 (K3 + pAN92) and $\Delta pstC$ + pAN92 (BER006). The survival rate of the $\Delta pstCAB$ mutant strain was significantly lower than the survival rates of every strain at each time point. From 2 to 3 h of exposure to rabbit serum, the $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ were significantly more sensitive to serum than the wild-type strain. No significant differences were observed between the wild-type $\chi 7122$ strain and the $\Delta pstC/\Delta phoB$, $\Delta phoB$, CK3 and $\Delta pstC$ + pAN92 strains. The control strain 862 did not survive after 1 h of exposure to 90% rabbit serum (data not shown). Analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was used for statistical analyses ($P < 0.05$).

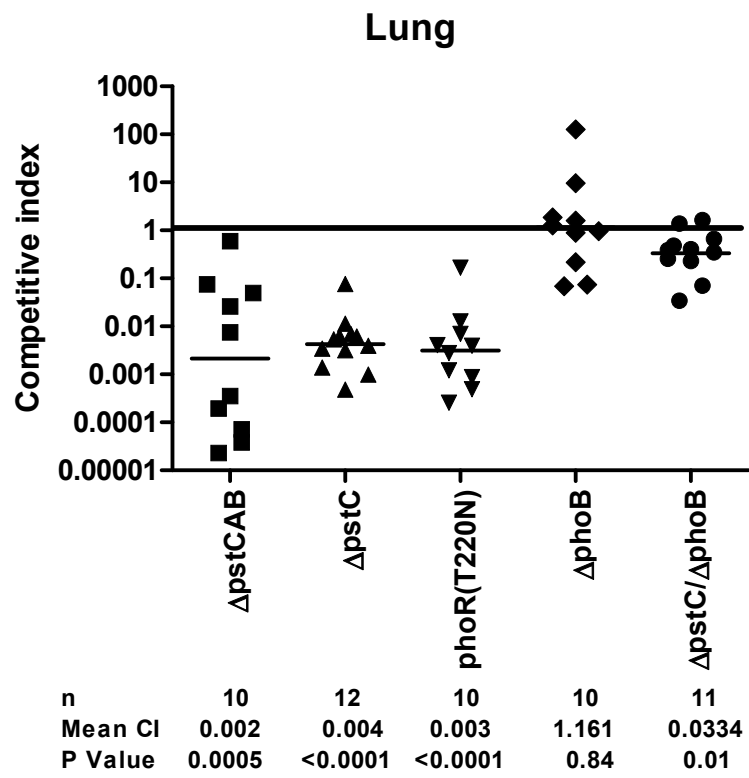
Figure 2. Minimal bacterial titers allowing yeast agglutination of APEC $\chi 7122$, isogenic mutants and complemented strains.

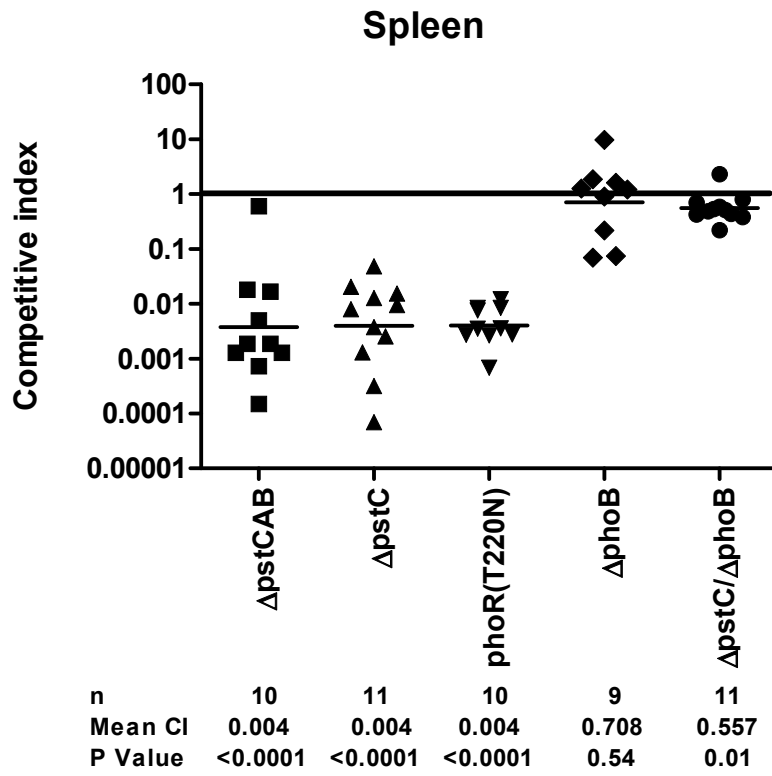


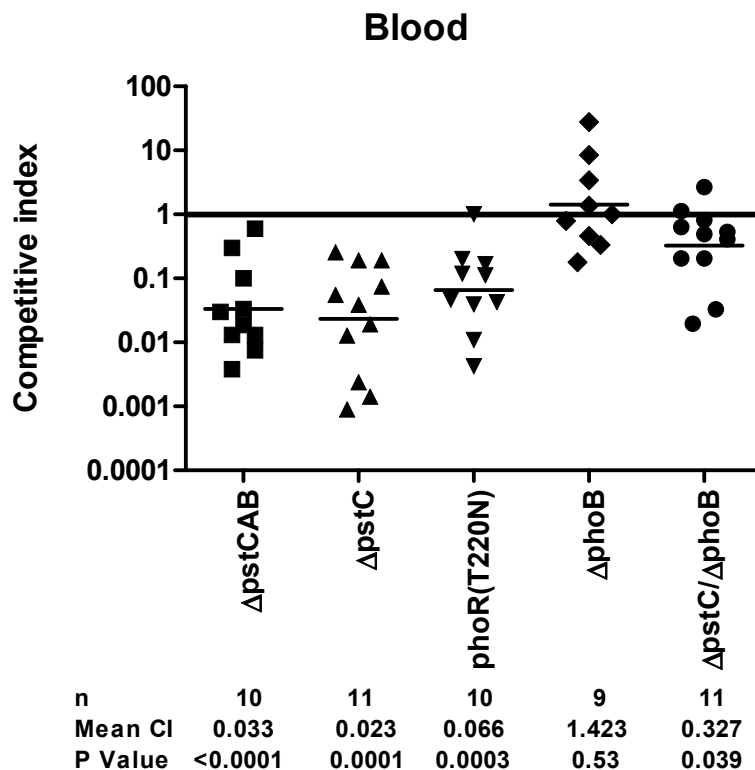
Data presented are the means \pm the standard deviations of three independent experiments. Strains tested were wild-type APEC strain $\chi 7122$, $\Delta pstCAB$ (K3), $\Delta pstC$ (BER002), $phoR(T220N)$ (BER005), $\Delta phoB$ (BER001), $\Delta pstC/\Delta phoB$ (BER004), CK3 (K3 + pAN92) and $\Delta pstC$ + pAN92 (BER006). The $\chi 7122 \Delta fim$ ($\chi 7279$) strain was used as negative control. The ∞ symbol shows no agglutination was observed at the highest cell titer for the $\Delta pstCAB$ strain, which was also observed for Δfim strain $\chi 7279$ (data not shown). Asterisks indicate significant differences observed between bacterial titers of the wild-type $\chi 7122$ and both $\Delta pstC$ and $phoR(T220N)$ mutant strains ($P < 0.05$) as calculated by Student's T-test.

Figure 3. Competitive indexes from different organs of chickens coinfecting with APEC χ 7122 isogenic mutants and virulent χ 7122 $\Delta lacZ$ derivative strain QT51.









Mixture of each of the $\chi 7122$ isogenic mutants and the virulent $\chi 7122$ $\Delta lacZ$ derivative strain QT51 were inoculated in young pathogen-free chickens. At 48 h post-infection, heart blood (A), lungs (B), spleens (C) and livers (D) were collected and bacterial counts determined. Results are shown as CI (mutant/strain QT51) and normalized for the inoculum. CI values inferior to 1 indicate a decreased capacity for the mutant to compete with the virulent test strain. Horizontal bars indicate the geometric mean CI values. Each point represents a CI value from a blood or tissue sample from an individual chicken. The table summarizes the number of animals sampled (n), the geometric mean of the CI (Mean CI) and the P value from a two-tailed T-test. Asterisks indicate that logarithmically transformed CIs differed significantly from 0 ($P < 0.05$). Strains tested were $\Delta pstCAB$ (K3), $\Delta pstC$ (BER002), $phoR(T220N)$ (BER005), $\Delta phoB$ (BER001) and $\Delta pstC/\Delta phoB$ (BER004).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le régulon Pho gouverne un ensemble de gènes répondant aux fluctuations en phosphate afin de maintenir l'état homéostatique. Ce circuit métabolique est largement répandu à travers le règne procaryote tout en étant spécifique selon les différentes niches colonisées et modes de vie bactériens. D'ordre général, le régulon Pho est conjointement régi par TCS PhoBR et le système Pst. En effet, une mutation à l'intérieur du système Pst mène à l'activation constitutive du régulon Pho. Diverses études antérieures effectuées par notre groupe de recherche ont démontré qu'une mutation du système Pst, chez la souche APEC $\chi 7122$, mène à l'atténuation de la virulence dans un modèle d'infection *in vivo* aviaire et affecte plusieurs traits de virulence. Il a aussi été démontré que cette mutation engendre des perturbations au niveau de la constitution de la membrane bactérienne notamment via des modifications du lipide A et des acides gras. De plus, l'analyse transcriptomique du mutant *pst* a mis en lumière certains mécanismes moléculaires reliant le régulon Pho à divers circuits métaboliques dont ceux des réponses aux stress (34, 103-105).

Les effets observés chez le mutant *pst* de la souche $\chi 7122$ pourraient être occasionnés par l'activation constitutive du régulon Pho ou par l'absence d'un système d'acquisition du phosphate Pst fonctionnel. Il a été avancé que différents systèmes d'acquisition du phosphate tels que les systèmes Pit pouvaient permettre de compenser pour l'abolition du système Pst dans les conditions étudiées (73, 77). Il serait aussi vraisemblable que l'atténuation de $\chi 7122$ soit attribuable à l'activité continue du TCS PhoBR chez le mutant *pst*.

Le présent objectif visait à dissocier le rôle du TCS PhoBR de celui du système Pst dans la virulence d'une souche APEC O78. Globalement, les résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire montrent que l'activation du régulon Pho via le système à deux composantes PhoBR est responsable de l'atténuation observée chez le mutant *pst* $\chi 7122$. Les données récoltées dans cette étude indiquent aussi une corrélation entre le niveau d'activation du régulon Pho et le degré d'atténuation. Enfin, les présentes observations établissent que dans ce modèle de virulence la

protéine régulatrice PhoB n'est pas nécessaire à la virulence chez la souche APEC χ 7122.

1. APEC

Les APEC sont généralement responsables d'infection extra-intestinales. Le mode de transmission s'effectue par la voie fécale-orale. En fait, le site primaire de contamination est le tractus respiratoire de la volaille. S'en suit une infection systémique potentiellement létale caractérisée par une inflammation des sacs aériens, une péricardite, une périhépatite, une péritonite, une entérite et une septicémie. Parmi les multiples sérogroupes des APEC, les plus fréquemment isolés d'infections sont les O1:K1, O2:K1 et O78:K80 (39, 53, 54). Actuellement, le génome d'une souche O1:K1 est disponible (86). Le séquençage du plasmide pAPEC-1 de la souche χ 7122 O78:K80 est disponible (131) et celui de la souche elle-même devrait être terminé sous peu. De plus, les souches APEC partagent des traits de virulence avec des souches humaines isolées de méningites néonatales, d'infections urinaires et de septicémies. Ainsi, les APEC représentent un risque notable de zoonose (87) et l'ensemble du matériel génétique de virulence peut être utilisé comme un réservoir pour le transfert horizontal (52).

2. État d'activation du régulon Pho chez les différents mutants

Afin de distinguer la contribution spécifique du système à deux composantes PhoBR versus celle du système Pst dans la virulence de la souche APEC χ 7122, les mutants $\Delta pstC$, $\Delta phoB$, $\Delta pstC/\Delta phoB$ and $phoR(T220N)$ ont été générés et un mutant créé précédemment dans notre laboratoire (103), $\Delta pstCAB$, a été utilisé (Table 1; article). Chez les mutants $\Delta pstC$, $phoR(T220N)$ et $\Delta pstCAB$, le régulon Pho est activé de manière constitutive tel qu'indiqué par les dosages de la phosphatase alcaline (Table 3; article). En effet, en milieu riche en phosphate (LB), l'activité de PhoA de ces 3 mutants est statistiquement significative comparativement à l'ensemble des autres souches dont la sauvage. Fait à noter, l'état d'activation du régulon se démarque significativement chez la souche $\Delta pstCAB$ et ce, autant en LB qu'en milieu

pauvre en phosphate (LP). Par ailleurs, le double mutant $\Delta pstC/\Delta phoB$ ne possède aucune activité de PhoA ni LB, ni en LP. Ceci indique que l'activité constitutive du régulon Pho chez le mutant $\Delta pstC$ est dépendante de *phoB*.

3. L'activité du régulon Pho mène à l'atténuation de la virulence

La présente étude rapporte que l'activité du régulon Pho, via le TCS PhoBR résulte en l'atténuation de la virulence chez la souche $\chi 7122$. En fait, l'ensemble des souches dont le régulon Pho est actif sont affectées pour chacun des tests *in vivo* et *in vitro*. Ce constat est en accord avec des études précédentes. Par exemple, chez une souche EPEC atypique et chez *C. rodentium*, le système Pst participe à la virulence via l'élément régulateur PhoB. En effet, les phénotypes d'adhérence chez les mutants *pst* sont restaurés en éliminant *phoB*. Ainsi, les auteurs concluent que le défaut d'adhérence observé chez les mutants *pst* résulte de la diminution de production d'une adhésine inconnue régulée par PhoB (28). D'un autre côté, le système Pst peut agir indépendamment du régulon Pho. En effet, la délétion de l'opéron *pst* chez une souche EPEC diminue l'expression d'adhésines et l'adhérence *in vitro*. Dans ce cas, ce processus n'implique par l'activation du régulon Pho puisque les auteurs ont montré qu'un double mutant $\Delta pstC/\Delta phoB$ demeure déficient pour les phénotypes d'adhérence. De plus, un mutant *phoR(T220N)*, dont le régulon Pho est constitutif et le système Pst est intact, n'a pas d'impact sur l'adhérence de la souche (56). Or, les présents résultats sont à l'opposé de ceux-ci puisqu'une mutation *phoR(T220N)* mène à l'atténuation de la souche APEC $\chi 7122$ tandis qu'une double mutation $\Delta pstC/\Delta phoB$ restaure les traits de virulence. Subséquemment, *phoB* est épistatique à *pst* en termes de contrôle de la virulence. L'ensemble des observations de cette étude soutiennent que l'activation du régulon Pho, plutôt que l'abolition du système Pst, est responsable de l'atténuation de la virulence chez la souche APEC $\chi 7122$.

4. PhoB n'est pas nécessaire à la virulence

Les résultats de notre étude établissent que dans notre modèle de virulence *phoB* n'est pas nécessaire à la virulence de la souche APEC χ 7122. Ainsi, il est possible de suggérer que PhoB et l'activation du régulon ne sont pas nécessaires à la virulence. En effet, le mutant $\Delta phoB$ est autant virulent que la souche sauvage et ce, pour l'ensemble des essais *in vitro* et *in vivo*. Or, ceci est surprenant puisqu'une étude précédente a identifié *phoB* comme étant préférentiellement exprimé *in vivo* chez cette même souche (46). Cette dernière observation laisse donc croire que *phoB* est impliqué lors du processus d'infection de l'hôte. Par ailleurs, d'autres microorganismes montrent des phénotypes différents à ceux observés dans la présente étude. Par exemple, en absence de PhoB, la souche *Vibrio cholerae* O1 colonise moins l'iléon de lapin dans un modèle de coinfection *ex vivo*, phénotype dû à la répression de gènes de virulence (211, 212).

5. Le degré de virulence corrèle avec le taux d'activation du régulon Pho

Les résultats de la présente étude démontrent que le degré de virulence corrèle avec le taux d'activation du régulon Pho chez *E. coli*. En effet, les résultats obtenus pour les tests de résistance à l'effet bactéricide du sérum et d'agglutination des levures corrèlent significativement avec ceux du dosage de la phosphatase alcaline chez les mutants $\Delta pstCAB$, $\Delta pstC$ et *phoR(T220N)* (Figure 1, 2 et Table 3 respectivement; article). Le niveau d'activation du régulon Pho est plus exacerbé chez le mutant $\Delta pstCAB$ que les deux mutants $\Delta pstC$ et *phoR(T220N)*. Comme démontré par les dosages de PhoA, la mutation *phoR(T220N)* est déficiente quant à sa fonction inhibitrice (activité phosphatase sur PhoB phosphorylé) mais, conserve sa capacité à activer PhoB. En fait, la mutation *phoR(T220N)* est connue pour résulter en un phénotype modeste d'activation du régulon Pho (213, 229) puisque cette mutation ponctuelle se situe à l'intérieur du domaine de dimérisation et d'autophosphorylation de PhoR (25). D'un autre côté, le niveau d'activité de PhoA chez le mutant $\Delta pstCAB$ est plus fort que celui du mutant $\Delta pstC$ en LB. Ceci est possiblement dû à l'absence

des composantes PstA (perméase) et PstB (ATPase) chez le mutant $\Delta pstC$. D'ailleurs, il a été suggéré que PstB soit important dans le processus d'inhibition du régulon Pho en agissant de concert avec PhoU (214). Il est aussi possible que la différence génétique entre $\Delta pstCAB$ et $\Delta pstC$ soit à la source des différences phénotypiques observées entre ces mutants. En ce sens, la région 3' de l'ARNm de *pstA* favoriserait la traduction de *rpoS* (175). De plus, RpoS inhibe l'expression des gènes transcrits par l'ARNP σ^{70} tels que les membres du régulon Pho (184). Somme toute, il est probable qu'une induction plus forte du régulon Pho engendre une surexpression des gènes associés directement ou indirectement avec la pathogenèse d'*E. coli*.

6. Complémentation des mutants

La complémentation des mutants $\Delta pstCAB$ et $\Delta pstC$ rétablit les phénotypes sauvages de l'activité de PhoA, de l'agglutination des levures, de la résistance aux effets bactéricides du sérum et au stress oxydatif (Table 3, Figure 2, Figure 1 et Table 4 respectivement; article). Les compléments n'ont pas été vérifiés dans le modèle de coinfection *in vivo* aviaire pour des motifs éthiques et économiques. De plus, une étude précédente a montré que le complément du mutant $\Delta pstCAB$ chez la même souche restaurait le phénotype sauvage dans un modèle d'infection aviaire (103). Par ailleurs, la complémentation du mutant *phoR(T220N)* en utilisant un plasmide-*phoBR* à faible copie ne fut pas concluante. Ceci s'explique probablement par le fait que *phoR(T220N)* est une mutation dominante dans la mesure où son taux d'auto-phosphorylation est supérieur à son activité phosphatase.

7. L'activation du régulon Pho diminue la production des fimbriae de type 1

L'activation du régulon Pho diminue la production des fimbriae de type 1 comme démontré par le test d'agglutination aux levures (Figure 2; article). Ce modèle a été utilisé puisque les levures sont riches en mannose, molécules étant reconnues par les adhésines de fimbriae de type 1. Des études antérieures montrent que certains gènes impliqués dans la biosynthèse des fimbriae de type 1 sont réprimés chez le

mutant $\Delta pstCAB$ (34). Les mécanismes moléculaires reliant l'inhibition de l'expression du fimbriae de type 1 par le régulon Pho sont étudiés par le groupe du Dr Charles M. Dozois (résultats non-publiés). De plus, les fimbriae de type 1 sont préférentiellement exprimés au niveau du site initial des infections aviaires, soit les sacs aériens et les poumons (45, 158). Du coup, une production diminuée des fimbriae de type 1 chez les mutants Pho constitutifs altérerait leur colonisation primaire expliquant ainsi, du moins en partie, l'atténuation de leur virulence.

8. L'activation du régulon Pho réduit la résistance au stress oxydatif

L'activation du régulon Pho réduit la résistance au stress oxydatif comme le démontre les résultats du test de résistance au peroxyde d'hydrogène (Table 4; article). D'ailleurs, la capacité de résister aux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) est cruciale pour la virulence bactérienne notamment face au système immunitaire de l'hôte et à divers ions métalliques. Une étude précédente (34) a observé que des gènes impliqués dans la réponse aux ROS sont différentiellement exprimés chez le mutant $\Delta pstCAB$ comparativement à la souche sauvage $\chi 7122$; des gènes appartenant aux régulons RpoS, OxyR et SoxR. Il a aussi été suggéré que les mutants dont le régulon Pho est activé de manière constitutive ne soient pas en mesure de résister aux stress oxydatifs externes puisqu'ils subiraient déjà un stress oxydatif durant leur croissance.

9. L'activation du régulon Pho réduit la résistance à l'effet bactéricide du sérum

L'activation du régulon Pho réduit la résistance à l'effet bactéricide du sérum de lapin (Figure 1). Chez les souches APEC, la capacité à causer la septicémie est fortement corrélée au niveau de résistance à l'effet bactéricide du sérum (101, 130). Fait à noter, la résistance à l'effet bactéricide du sérum est un phénomène multifactoriel. Par exemple, une combinaison appropriée de l'expression des antigènes de capsules K et des polysaccharides O peut protéger adéquatement de

l'attaque par la cascade du complément (67, 143, 221). En fait, un mutant O78-négatif de la souche χ 7122 est sensible au sérum et est éliminé des organes et des fluides des poulets infectés (130). Par ailleurs, une étude précédente a montré que le régulon Pho est impliqué dans des modifications du lipide A, dont une diminution de 66% de la forme 1-pyrophosphatée du lipide A (105). Ainsi, l'activation du régulon Pho participerait à l'augmentation de la sensibilité face aux effets bactéricides du sérum en contribuant à perturber la surface bactérienne (103).

10. L'activation du régulon Pho affecte la virulence *in vivo*

L'activation du régulon Pho affecte la virulence *in vivo* dans un modèle de coinfection aviaire (Figure 3; article). Ceci indique que dans ces conditions *in vivo*, l'activation constitutive du régulon Pho représente un désavantage sélectif en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte. En fait, le déploiement des facteurs de virulence lors d'une infection requiert une régulation organisée et ce, dans un contexte spatio-temporel spécifique. En résumé, une bactérie dont l'orchestration de sa réponse adaptative est déficiente échouera dans son processus de pathogenèse et sera pour ainsi dire, atténuée.

CONCLUSION

En conclusion, ce mémoire fait le point sur le rôle spécifique du TCS PhoBR et du système Pst dans la virulence de la souche APEC χ 7122. Nous avons constaté que l'activation constitutive du régulon Pho est responsable de l'atténuation de la virulence. Nous avons démontré que les multiples phénotypes altérés chez les mutants *pst* sont causés par l'état d'activation continue de PhoB et non pas par l'interruption du transport du phosphate par le système Pst. En effet, l'activation continue de PhoB affecte divers traits de virulence dont l'adhésion médiées par les fimbriae de type 1, la résistance à l'effet bactéricide du sérum et au stress oxydatif. De plus, le potentiel de virulence est diminué pour les souches Pho constitutives dans un modèle de coinfection aviaire *in vivo*.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que PhoB n'est pas nécessaire à la virulence chez la souche χ 7122. Nous suggérons aussi, sur la base de nos données, que la virulence est inversement proportionnelle au niveau d'activation du régulon Pho chez *E. coli*.

En somme, nos résultats mettent en évidence que PhoB a une double fonction puisque il est non seulement l'élément régulateur de l'homéostasie du phosphate mais aussi, il module des attributs de la virulence bactérienne. Néanmoins, on doit considérer le fait qu'au-delà du rôle conservé que tient le régulon Pho à travers le règne bactérien, il est indéniable que des déterminants propres à chaque espèce y aient été intégrés. Ainsi, le régulon Pho est un système de régulation en évolution perpétuelle.

PERSPECTIVES

Pour les années à venir, il sera important de développer des approches novatrices afin de prévenir et contrôler les infections bactériennes en regard de la problématique concernant la résistance aux antibiotiques. En ce sens, les souches Pho constitutives représentent des candidats potentiels pour la conception de vaccins atténués puisque le niveau d'atténuation de virulence peut être contrôlé par le type de mutations au niveau des opérons *phoBR* et *pstSCAB-phoU*. En effet, un vaccin atténué doit d'être suffisamment présent et persistant pour induire une réponse immunitaire tout en minimisant les effets de virulence (59). Dans le cas particulier des infections causées par les APEC, la diversité des sérogroupes recensés rend la vaccination peu pratiquée puisqu'un vaccin ciblant simultanément des souches de différents sérogroupes n'est pas disponible (39). Afin d'être plus efficaces, les futures stratégies d'immunisation doivent considérer l'utilisation de vaccins ciblant un assortiment des principaux sérogroupes d'APEC (141).

SOURCES DOCUMENTAIRES

1. **Abdel-Fattah, W. R., Y. Chen, A. Eldakak, and F. M. Hulett.** 2005. *Bacillus subtilis* phosphorylated PhoP: direct activation of the E(sigma)A- and repression of the E(sigma)E-responsive *phoB-PS+V* promoters during pho response. *J Bacteriol* **187**:5166-5178.
2. **Aguena, M., G. M. Ferreira, and B. Spira.** 2009. Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **191**:105-112.
3. **Aguena, M., E. Yagil, and B. Spira.** 2002. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **268**:518-524.
4. **Allen, M. P., K. B. Zumbrennen, and W. R. McCleary.** 2001. Genetic evidence that the alpha5 helix of the receiver domain of PhoB is involved in interdomain interactions. *J Bacteriol* **183**:2204-2211.
5. **Apel, A. K., A. Sola-Landa, A. Rodriguez-Garcia, and J. F. Martin.** 2007. Phosphate control of *phoA*, *phoC* and *phoD* gene expression in *Streptomyces coelicolor* reveals significant differences in binding of PhoP to their promoter regions. *Microbiology* **153**:3527-3537.
6. **Arribas-Bosacoma, R., S. K. Kim, C. Ferrer-Orta, A. G. Blanco, P. J. Pereira, F. X. Gomis-Ruth, B. L. Wanner, M. Coll, and M. Sola.** 2007. The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol* **366**:626-641.
7. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006.0008.
8. **Bachhawat, P., G. V. Swapna, G. T. Montelione, and A. M. Stock.** 2005. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure* **13**:1353-1363.
9. **Baek, J. H., Y. J. Kang, and S. Y. Lee.** 2007. Transcript and protein level analyses of the interactions among PhoB, PhoR, PhoU and CreC in response

- to phosphate starvation in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett **277**:254-259.
10. **Baek, J. H., and S. Y. Lee.** 2006. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett **264**:104-109.
 11. **Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockett, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang, and M. S. Donnenberg.** 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. Mol Microbiol **45**:1079-1093.
 12. **Barrett, J. F., R. M. Goldschmidt, L. E. Lawrence, B. Foleno, R. Chen, J. P. Demers, S. Johnson, R. Kanojia, J. Fernandez, J. Bernstein, L. Licata, A. Donetz, S. Huang, D. J. Hlasta, M. J. Macielag, K. Ohemeng, R. Frechette, M. B. Froscio, D. H. Klaubert, J. M. Whiteley, L. Wang, and J. A. Hoch.** 1998. Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:5317-5322.
 13. **Beier, D., and R. Gross.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. Curr Opin Microbiol **9**:143-152.
 14. **Blanco, A. G., M. Sola, F. X. Gomis-Ruth, and M. Coll.** 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. Structure **10**:701-713.
 15. **Bochner, B. R., P. Gadzinski, and E. Panomitros.** 2001. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. Genome Res **11**:1246-1255.
 16. **Bourret, R. B.** 2008. Signal transduction meets systems biology: deciphering specificity determinants for protein-protein interactions. Mol Microbiol **69**:1336-1340.
 17. **Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. Infect Immun **70**:6032-6042.

18. **Braibant, M., P. Lefevre, L. de Wit, P. Peirs, J. Ooms, K. Huygen, A. B. Andersen, and J. Content.** 1996. A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* **176**:171-176.
19. **Brickman, E., and J. Beckwith.** 1975. Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and phi80 transducing phages. *J Mol Biol* **96**:307-316.
20. **Buckles, E. L., X. Wang, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, and M. S. Sonnenberg.** 2006. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology* **152**:153-160.
21. **Burgess, R. R., A. A. Travers, J. J. Dunn, and E. K. Bautz.** 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**:43-46.
22. **Burut-Archanai, S., A. Incharoensakdi, and J. J. Eaton-Rye.** 2009. The extended N-terminal region of SphS is required for detection of external phosphate levels in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* **378**:383-388.
23. **Busby, S., and R. H. Ebright.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**:199-213.
24. **Cardona, P. J., J. G. Asensio, A. Arbues, I. Ota, C. Lafoz, O. Gil, N. Caceres, V. Ausina, B. Gicquel, and C. Martin.** 2009. Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on *phoP* mutant. *Vaccine* **27**:2499-2505.
25. **Carmany, D. O., K. Hollingsworth, and W. R. McCleary.** 2003. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol* **185**:1112-1115.
26. **Carrero-Lerida, J., A. Moraleda-Munoz, R. Garcia-Hernandez, J. Perez, and J. Munoz-Dorado.** 2005. PhoR1-PhoP1, a third two-component system of the family PhoRP from *Myxococcus xanthus*: role in development. *J Bacteriol* **187**:4976-4983.

27. **Chan, F. Y., and A. Torriani.** 1996. PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* **178**:3974-3977.
28. **Cheng, C., S. M. Tennant, K. I. Azzopardi, V. Bennett-Wood, E. L. Hartland, R. M. Robins-Browne, and M. Tauschek.** 2009. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **77**:1936-1944.
29. **Cherepanov, P. P., and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9-14.
30. **Conlin, C. A., S. L. Tan, H. Hu, and T. Segar.** 2001. The *apeE* gene of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium is induced by phosphate limitation and regulated by *phoBR*. *J Bacteriol* **183**:1784-1786.
31. **Cotter, P. A., and V. J. DiRita.** 2000. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu Rev Microbiol* **54**:519-565.
32. **Cox, G. B., D. Webb, J. Godovac-Zimmermann, and H. Rosenberg.** 1988. Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *J Bacteriol* **170**:2283-2286.
33. **Cox, G. B., D. Webb, and H. Rosenberg.** 1989. Specific amino acid residues in both the PstB and PstC proteins are required for phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system. *J Bacteriol* **171**:1531-1534.
34. **Crepin, S., M. G. Lamarche, P. Garneau, J. Seguin, J. Proulx, C. M. Dozois, and J. Harel.** 2008. Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. *BMC Genomics* **9**:568.
35. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect Immun* **63**:4924-4927.
36. **Danhorn, T., M. Hentzer, M. Givskov, M. R. Parsek, and C. Fuqua.** 2004. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen

- Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. J Bacteriol **186**:4492-4501.
37. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:6640-6645.
 38. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. Clin Microbiol Rev **20**:79-114.
 39. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res **30**:299-316.
 40. **Diaz, M., A. Esteban, J. M. Fernandez-Abalos, and R. I. Santamaria.** 2005. The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. Microbiology **151**:2583-2592.
 41. **Dieye, Y., K. Ameiss, M. Mellata, and R. Curtiss, 3rd.** 2009. The Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. BMC Microbiol **9**:3.
 42. **Dobrindt, U., and J. Hacker.** 2008. Targeting virulence traits: potential strategies to combat extraintestinal pathogenic *E. coli* infections. Curr Opin Microbiol **11**:409-413.
 43. **Dombroski, A. J., W. A. Walter, and C. A. Gross.** 1993. The role of the sigma subunit in promoter recognition by RNA polymerase. Cell Mol Biol Res **39**:311-317.
 44. **Dombroski, A. J., W. A. Walter, M. T. Record, Jr., D. A. Siegele, and C. A. Gross.** 1992. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. Cell **70**:501-512.
 45. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1

- (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis **38**:231-239.
46. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc Natl Acad Sci U S A **100**:247-252.
 47. **Ebright, R. H., and S. Busby.** 1995. The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. Curr Opin Genet Dev **5**:197-203.
 48. **Eguchi, Y., J. Itou, M. Yamane, R. Demizu, F. Yamato, A. Okada, H. Mori, A. Kato, and R. Utsumi.** 2007. B1500, a small membrane protein, connects the two-component systems EvgS/EvgA and PhoQ/PhoP in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **104**:18712-18717.
 49. **Eldakak, A., and F. M. Hulett.** 2007. Cys303 in the histidine kinase PhoR is crucial for the phosphotransfer reaction in the PhoPR two-component system in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol **189**:410-421.
 50. **Ellison, D. W., and W. R. McCleary.** 2000. The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain. J Bacteriol **182**:6592-6597.
 51. **Erickson, M. G., A. T. Ulijasz, and B. Weisblum.** 2008. Screening for compounds that affect the interaction between bacterial two-component signal transduction response regulator protein and cognate promoter DNA. Methods Mol Med **142**:215-222.
 52. **Ewers, C., E. M. Antao, I. Diehl, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2009. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. Appl Environ Microbiol **75**:184-192.
 53. **Ewers, C., T. Janssen, S. Kiessling, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet Microbiol **104**:91-101.
 54. **Ewers, C., T. Janssen, and L. H. Wieler.** 2003. [Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr **116**:381-395.

55. **Falkow, S.** 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 2**:S274-276.
56. **Ferreira, G. M., and B. Spira.** 2008. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. *Microbiology* **154**:2025-2036.
57. **Fiedler, U., and V. Weiss.** 1995. A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J* **14**:3696-3705.
58. **Fischer, R. J., S. Oehmcke, U. Meyer, M. Mix, K. Schwarz, T. Fiedler, and H. Bahl.** 2006. Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J Bacteriol* **188**:5469-5478.
59. **Frey, J.** 2007. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* **25**:5598-5605.
60. **Gao, R., and A. M. Stock.** 2009. Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**:133-154.
61. **Gao, R., Y. Tao, and A. M. Stock.** 2008. System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol Microbiol* **69**:1358-1372.
62. **Gebhard, S., and G. M. Cook.** 2008. Differential regulation of high-affinity phosphate transport systems of *Mycobacterium smegmatis*: identification of PhnF, a repressor of the *phnDCE* operon. *J Bacteriol* **190**:1335-1343.
63. **Gebhard, S., S. L. Tran, and G. M. Cook.** 2006. The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate. *Microbiology* **152**:3453-3465.
64. **Ghorbel, S., J. Kormanec, A. Artus, and M. J. Virolle.** 2006. Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24. *J Bacteriol* **188**:677-686.

65. **Gilmour, R., J. E. Foster, Q. Sheng, J. R. McClain, A. Riley, P. M. Sun, W. L. Ng, D. Yan, T. I. Nicas, K. Henry, and M. E. Winkler.** 2005. New class of competitive inhibitor of bacterial histidine kinases. *J Bacteriol* **187**:8196-8200.
66. **Glover, R. T., J. Kriakov, S. J. Garforth, A. D. Baughn, and W. R. Jacobs, Jr.** 2007. The two-component regulatory system *senX3-regX3* regulates phosphate-dependent gene expression in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **189**:5495-5503.
67. **Goldman, R. C., K. Joiner, and L. Leive.** 1984. Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. *J Bacteriol* **159**:877-882.
68. **Goldstein, D. M., N. S. Gray, and P. P. Zarrinkar.** 2008. High-throughput kinase profiling as a platform for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**:391-397.
69. **Gonin, M., E. M. Quardokus, D. O'Donnol, J. Maddock, and Y. V. Brun.** 2000. Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **182**:337-347.
70. **Goulart, C. L., L. M. Lery, M. M. Diniz, J. L. Vianez-Junior, A. G. Neves-Ferreira, J. Perales, P. M. Bisch, and W. M. von Kruger.** 2009. Molecular analysis of VCA1008: a putative phosphoprotein of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* **298**:241-248.
71. **Gristwood, T., P. C. Fineran, L. Everson, N. R. Williamson, and G. P. Salmond.** 2009. The PhoBR two-component system regulates antibiotic biosynthesis in *Serratia* in response to phosphate. *BMC Microbiol* **9**:112.
72. **Haldimann, A., L. L. Daniels, and B. L. Wanner.** 1998. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon. *J Bacteriol* **180**:1277-1286.

73. **Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt, and G. B. Cox.** 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:5008-5014.
74. **Hellingwerf, K. J., P. W. Postma, J. Tommassen, and H. V. Westerhoff.** 1995. Signal transduction in bacteria: phospho-neural network(s) in *Escherichia coli*? *FEMS Microbiol Rev* **16**:309-321.
75. **Herrou, J., A. S. Debrie, E. Willery, G. Renaud-Mongenie, C. Locht, F. Mooi, F. Jacob-Dubuisson, and R. Antoine.** 2009. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One* **4**:e6996.
76. **Hiratsu, K., A. Nakata, H. Shinagawa, and K. Makino.** 1995. Autophosphorylation and activation of transcriptional activator PhoB of *Escherichia coli* by acetyl phosphate *in vitro*. *Gene* **161**:7-10.
77. **Hoffer, S. M., and J. Tommassen.** 2001. The phosphate-binding protein of *Escherichia coli* is not essential for P(i)-regulated expression of the pho regulon. *J Bacteriol* **183**:5768-5771.
78. **Hoffer, S. M., H. V. Westerhoff, K. J. Hellingwerf, P. W. Postma, and J. Tommassen.** 2001. Autoamplification of a two-component regulatory system results in "learning" behavior. *J Bacteriol* **183**:4914-4917.
79. **Howell, A. B.** 2007. Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections. *Mol Nutr Food Res* **51**:732-737.
80. **Hulett, F. M.** 1996. The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**:933-939.
81. **Hulett, F. M., J. Lee, L. Shi, G. Sun, R. Chesnut, E. Sharkova, M. F. Duggan, and N. Kapp.** 1994. Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **176**:1348-1358.
82. **Ishige, T., M. Krause, M. Bott, V. F. Wendisch, and H. Sahm.** 2003. The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *J Bacteriol* **185**:4519-4529.

83. **Jacobsen, S. M., M. C. Lane, J. M. Harro, M. E. Shirtliff, and H. L. Mobley.** 2008. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**:180-193.
84. **Jans, D. A., A. L. Fimmel, L. Langman, L. B. James, J. A. Downie, A. E. Senior, G. R. Ash, F. Gibson, and G. B. Cox.** 1983. Mutations in the *uncE* gene affecting assembly of the c-subunit of the adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochem J* **211**:717-726.
85. **Jiang, W., W. W. Metcalf, K. S. Lee, and B. L. Wanner.** 1995. Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonate pathway of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* **177**:6411-6421.
86. **Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M. Lynne, J. R. Johnson, and L. K. Nolan.** 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**:3228-3236.
87. **Johnson, T. J., Y. Wannemuehler, S. J. Johnson, A. L. Stell, C. Doetkott, J. R. Johnson, K. S. Kim, L. Spanjaard, and L. K. Nolan.** 2008. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* **74**:7043-7050.
88. **Juntarajumnong, W., T. A. Hirani, J. M. Simpson, A. Incharoensakdi, and J. J. Eaton-Rye.** 2007. Phosphate sensing in *Synechocystis* sp. PCC 6803: SphU and the SphS-SphR two-component regulatory system. *Arch Microbiol* **188**:389-402.
89. **Kaniga, K., M. S. Compton, R. Curtiss, 3rd, and P. Sundaram.** 1998. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* **66**:5599-5606.

90. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-141.
91. **Kato, A., and E. A. Groisman.** 2004. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev* **18**:2302-2313.
92. **Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:527-543.
93. **Kim, S. K., S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, K. S. Lee, B. L. Wanner, and K. Makino.** 2000. Dual transcriptional regulation of the *Escherichia coli* phosphate-starvation-inducible *psiE* gene of the phosphate regulon by PhoB and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J Bacteriol* **182**:5596-5599.
94. **Kim, S. K., K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, and H. Shinagawa.** 1995. Mutational analysis of the role of the first helix of region 4.2 of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB. *Mol Gen Genet* **248**:1-8.
95. **Kim, S. K., M. R. Wilmes-Riesenberg, and B. L. Wanner.** 1996. Involvement of the sensor kinase EnvZ in the *in vivo* activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol* **22**:135-147.
96. **Kimura, S., K. Makino, H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata.** 1989. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: characterization of the promoter of the *pstS* gene. *Mol Gen Genet* **215**:374-380.
97. **Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga, and H. Mori.** 2005. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**:291-299.

98. **Kocan, M., S. Schaffer, T. Ishige, U. Sorger-Herrmann, V. F. Wendisch, and M. Bott.** 2006. Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188**:724-732.
99. **Kondo, H., A. Nakagawa, J. Nishihira, Y. Nishimura, T. Mizuno, and I. Tanaka.** 1997. *Escherichia coli* positive regulator OmpR has a large loop structure at the putative RNA polymerase interaction site. *Nat Struct Biol* **4**:28-31.
100. **Kriakov, J., S. Lee, and W. R. Jacobs, Jr.** 2003. Identification of a regulated alkaline phosphatase, a cell surface-associated lipoprotein, in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **185**:4983-4991.
101. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**:27-35.
102. **Laaberki, M. H., N. Janabi, E. Oswald, and F. Repoila.** 2006. Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* **296**:197-210.
103. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* **73**:4138-4145.
104. **Lamarche, M. G., and J. Harel.** 2010. Membrane Homeostasis Requires Intact pst in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **60**:356-359.
105. **Lamarche, M. G., S. H. Kim, S. Crepin, M. Mourez, N. Bertrand, R. E. Bishop, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2008. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. *J Bacteriol* **190**:5256-5264.

106. **Lamarche, M. G., B. L. Wanner, S. Crepin, and J. Harel.** 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**:461-473.
107. **Laub, M. T., and M. Goulian.** 2007. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet* **41**:121-145.
108. **Levitz, R., I. Friedberg, R. Brucker, A. Fux, and E. Yagil.** 1985. The effect of the locus *pstB* on phosphate binding in the phosphate specific transport (PST) system of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **200**:118-122.
109. **Li, Y., S. Wang, G. Scarpellini, B. Gunn, W. Xin, S. Y. Wanda, K. L. Roland, and R. Curtiss, 3rd.** 2009. Evaluation of new generation *Salmonella enterica serovar* Typhimurium vaccines with regulated delayed attenuation to induce immune responses against PspA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:593-598.
110. **Li, Y., and Y. Zhang.** 2007. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2092-2099.
111. **Lilley, B. N., and B. L. Bassler.** 2000. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54. *Mol Microbiol* **36**:940-954.
112. **Liu, J., Y. Lou, H. Yokota, P. D. Adams, R. Kim, and S. H. Kim.** 2005. Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters. *J Biol Chem* **280**:15960-15966.
113. **Liu, W., and F. M. Hulett.** 1997. *Bacillus subtilis* PhoP binds to the *phoB* tandem promoter exclusively within the phosphate starvation-inducible promoter. *J Bacteriol* **179**:6302-6310.
114. **Mack, T. R., R. Gao, and A. M. Stock.** 2009. Probing the roles of the two different dimers mediated by the receiver domain of the response regulator PhoB. *J Mol Biol* **389**:349-364.
115. **Majumdar, A., A. Ghatak, and R. K. Ghosh.** 2005. Identification of the gene for the monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* serogroup O1 strain. *Gene* **344**:251-258.

116. **Makino, K., M. Amemura, T. Kawamoto, S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, and M. Suzuki.** 1996. DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* **259**:15-26.
117. **Makino, K., M. Amemura, S. K. Kim, A. Nakata, and H. Shinagawa.** 1993. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **7**:149-160.
118. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, S. Kimura, A. Nakata, and A. Ishihama.** 1988. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J Mol Biol* **203**:85-95.
119. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata.** 1986. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* **190**:37-44.
120. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, and A. Nakata.** 1986. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **192**:549-556.
121. **Makino, K., H. Shinagawa, and A. Nakata.** 1985. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: regulation and role of the regulatory gene *phoR*. *J Mol Biol* **184**:231-240.
122. **Marsden, B. D., and S. Knapp.** 2008. Doing more than just the structure-structural genomics in kinase drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **12**:40-45.
123. **Martin, C., A. Williams, R. Hernandez-Pando, P. J. Cardona, E. Gormley, Y. Bordat, C. Y. Soto, S. O. Clark, G. J. Hatch, D. Aguilar, V. Ausina, and B. Gicquel.** 2006. The live *Mycobacterium tuberculosis phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* **24**:3408-3419.
124. **Martinez-Hackert, E., and A. M. Stock.** 1997. The DNA-binding domain of OmpR: crystal structures of a winged helix transcription factor. *Structure* **5**:109-124.

125. **Martiny, A. C., M. L. Coleman, and S. W. Chisholm.** 2006. Phosphate acquisition genes in *Prochlorococcus* ecotypes: evidence for genome-wide adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12552-12557.
126. **Mascher, T., J. D. Helmann, and G. Unden.** 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:910-938.
127. **McCleary, W. R., and J. B. Stock.** 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**:31567-31572.
128. **McIntosh, M., S. Meyer, and A. Becker.** 2009. Novel *Sinorhizobium meliloti* quorum sensing positive and negative regulatory feedback mechanisms respond to phosphate availability. *Mol Microbiol* **74**:1238-1256.
129. **Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**:1-7.
130. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**:536-540.
131. **Mellata, M., J. W. Touchman, and R. Curtiss.** 2009. Full sequence and comparative analysis of the plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* chi7122 (O78:K80:H9). *PLoS One* **4**:e4232.
132. **Mendes, M. V., S. Tunca, N. Anton, E. Recio, A. Sola-Landa, J. F. Aparicio, and J. F. Martin.** 2007. The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of *phoP* reduces the negative phosphate regulation of pimarinic acid biosynthesis. *Metab Eng* **9**:217-227.
133. **Miller, J. F., J. J. Mekalanos, and S. Falkow.** 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**:916-922.
134. **Mitrophanov, A. Y., and E. A. Groisman.** 2008. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* **22**:2601-2611.

135. **Mizuno, T.** 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. DNA Res **4**:161-168.
136. **Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A. O'Toole.** 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. Mol Microbiol **63**:656-679.
137. **Monds, R. D., P. D. Newell, J. A. Schwartzman, and G. A. O'Toole.** 2006. Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. Appl Environ Microbiol **72**:1910-1924.
138. **Monds, R. D., M. W. Silby, and H. K. Mahanty.** 2001. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. Mol Microbiol **42**:415-426.
139. **Monsieurs, P., S. De Keersmaecker, W. W. Navarre, M. W. Bader, F. De Smet, M. McClelland, F. C. Fang, B. De Moor, J. Vanderleyden, and K. Marchal.** 2005. Comparison of the PhoPQ regulon in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J Mol Evol **60**:462-474.
140. **Moraleda-Munoz, A., J. Carrero-Lerida, J. Perez, and J. Munoz-Dorado.** 2003. Role of two novel two-component regulatory systems in development and phosphatase expression in *Myxococcus xanthus*. J Bacteriol **185**:1376-1383.
141. **Nagy, G., L. Emody, and T. Pal.** 2008. Strategies for the development of vaccines conferring broad-spectrum protection. Int J Med Microbiol **298**:379-395.
142. **Nakata, A., M. Amemura, and H. Shinagawa.** 1984. Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. J Bacteriol **159**:979-985.
143. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic

- Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**:5048-5056.
144. **Nikata, T., Y. Sakai, K. Shibata, J. Kato, A. Kuroda, and H. Ohtake.** 1996. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (pst) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* **250**:692-698.
145. **Oganessian, V., N. Oganessian, P. D. Adams, J. Jancarik, H. A. Yokota, R. Kim, and S. H. Kim.** 2005. Crystal structure of the "PhoU-like" phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. *J Bacteriol* **187**:4238-4244.
146. **Okada, A., Y. Gotoh, T. Watanabe, E. Furuta, K. Yamamoto, and R. Utsumi.** 2007. Targeting two-component signal transduction: a novel drug discovery system. *Methods Enzymol* **422**:386-395.
147. **Okamura, H., S. Hanaoka, A. Nagadoi, K. Makino, and Y. Nishimura.** 2000. Structural comparison of the PhoB and OmpR DNA-binding/transactivation domains and the arrangement of PhoB molecules on the phosphate box. *J Mol Biol* **295**:1225-1236.
148. **Okamura, H., K. Makino, and Y. Nishimura.** 2007. NMR dynamics distinguish between hard and soft hydrophobic cores in the DNA-binding domain of PhoB and demonstrate different roles of the cores in binding to DNA. *J Mol Biol* **367**:1093-1117.
149. **Paul, S., S. Birkey, W. Liu, and F. M. Hulett.** 2004. Autoinduction of *Bacillus subtilis* *phoPR* operon transcription results from enhanced transcription from EsigmaA- and EsigmaE-responsive promoters by phosphorylated PhoP. *J Bacteriol* **186**:4262-4275.
150. **Pazy, Y., A. C. Wollish, S. A. Thomas, P. J. Miller, E. J. Collins, R. B. Bourret, and R. E. Silversmith.** 2009. Matching biochemical reaction kinetics to the timescales of life: structural determinants that influence the autodephosphorylation rate of response regulator proteins. *J Mol Biol* **392**:1205-1220.

151. **Perez, E., S. Samper, Y. Bordas, C. Guilhot, B. Gicquel, and C. Martin.** 2001. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* **41**:179-187.
152. **Perez, J. C., and E. A. Groisman.** 2009. Transcription factor function and promoter architecture govern the evolution of bacterial regulons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:4319-4324.
153. **Perez, J. C., D. Shin, I. Zwir, T. Latifi, T. J. Hadley, and E. A. Groisman.** 2009. Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and Mg(2+) homeostasis. *PLoS Genet* **5**:e1000428.
154. **Persson, B. L., J. O. Lagerstedt, J. R. Pratt, J. Pattison-Granberg, K. Lundh, S. Shokrollahzadeh, and F. Lundh.** 2003. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**:225-244.
155. **Pham, V. D., C. W. Shebelut, I. R. Jose, D. A. Hodgson, D. E. Whitworth, and M. Singer.** 2006. The response regulator PhoP4 is required for late developmental events in *Myxococcus xanthus*. *Microbiology* **152**:1609-1620.
156. **Philippe, V. A., M. B. Mendez, I. H. Huang, L. M. Orsaria, M. R. Sarker, and R. R. Grau.** 2006. Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* **74**:3651-3656.
157. **Pinkner, J. S., H. Remaut, F. Buelens, E. Miller, V. Aberg, N. Pemberton, M. Hedenstrom, A. Larsson, P. Seed, G. Waksman, S. J. Hultgren, and F. Almqvist.** 2006. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:17897-17902.
158. **Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**:331-341.

159. **Pragai, Z., N. E. Allenby, N. O'Connor, S. Dubrac, G. Rapoport, T. Msadek, and C. R. Harwood.** 2004. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**:1182-1190.
160. **Pratt, J. T., E. McDonough, and A. Camilli.** 2009. PhoB regulates motility, biofilm and c-di-GMP in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **191**:6632-6642.
161. **Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun* **60**:4460-4467.
162. **Qi, Y., Y. Kobayashi, and F. M. Hulett.** 1997. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *J Bacteriol* **179**:2534-2539.
163. **Quester, I., and A. Becker.** 2004. Four promoters subject to regulation by ExoR and PhoB direct transcription of the *Sinorhizobium meliloti* *exoYFQ* operon involved in the biosynthesis of succinoglycan. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**:115-132.
164. **Rao, N. N., and A. Torriani.** 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **4**:1083-1090.
165. **Raser, J. M., and E. K. O'Shea.** 2005. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* **309**:2010-2013.
166. **Rasko, D. A., C. G. Moreira, R. Li de, N. C. Reading, J. M. Ritchie, M. K. Waldor, N. Williams, R. Taussig, S. Wei, M. Roth, D. T. Hughes, J. F. Huntley, M. W. Fina, J. R. Falck, and V. Sperandio.** 2008. Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* **321**:1078-1080.
167. **Robinson, V. L., D. R. Buckler, and A. M. Stock.** 2000. A tale of two components: a novel kinase and a regulatory switch. *Nat Struct Biol* **7**:626-633.
168. **Runyen-Janecky, L. J., A. M. Boyle, A. Kizzee, L. Liefer, and S. M. Payne.** 2005. Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **73**:1404-1410.

169. **Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd, and C. M. Dozois.** 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infect Immun* **76**:601-611.
170. **Santos-Beneit, F., A. Rodriguez-Garcia, E. Franco-Dominguez, and J. F. Martin.** 2008. Phosphate-dependent regulation of the low- and high-affinity transport systems in the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **154**:2356-2370.
171. **Santos-Beneit, F., A. Rodriguez-Garcia, A. Sola-Landa, and J. F. Martin.** 2009. Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription. *Mol Microbiol* **72**:53-68.
172. **Schaaf, S., and M. Bott.** 2007. Target genes and DNA-binding sites of the response regulator PhoR from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**:5002-5011.
173. **Scholten, M., R. Janssen, C. Bogaarts, J. van Strien, and J. Tommassen.** 1995. The pho regulon of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **15**:247-254.
174. **Scholten, M., and J. Tommassen.** 1993. Topology of the PhoR protein of *Escherichia coli* and functional analysis of internal deletion mutants. *Mol Microbiol* **8**:269-275.
175. **Schurdell, M. S., G. M. Woodbury, and W. R. McCleary.** 2007. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J Bacteriol* **189**:1150-1153.
176. **Shokrollahzadeh, S., B. Bonakdarpour, F. Vahabzadeh, and M. Sanati.** 2007. Growth kinetics and Pho84 phosphate transporter activity of *Saccharomyces cerevisiae* under phosphate-limited conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**:17-25.

177. **Siehnell, R. J., E. A. Worobec, and R. E. Hancock.** 1988. Regulation of components of the *Pseudomonas aeruginosa* phosphate-starvation-inducible regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2**:347-352.
178. **Sinai, A. P., and P. M. Bavoil.** 1993. Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**:1125-1137.
179. **Smith, M. W., and J. W. Payne.** 1992. Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **79**:183-190.
180. **Smits, W. K., O. P. Kuipers, and J. W. Veening.** 2006. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Microbiol* **4**:259-271.
181. **Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, R. A. Welch, and H. L. Mobley.** 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**:6373-6381.
182. **Sola-Landa, A., R. S. Moura, and J. F. Martin.** 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6133-6138.
183. **Sola-Landa, A., A. Rodriguez-Garcia, E. Franco-Dominguez, and J. F. Martin.** 2005. Binding of PhoP to promoters of phosphate-regulated genes in *Streptomyces coelicolor*: identification of PHO boxes. *Mol Microbiol* **56**:1373-1385.
184. **Spira, B., and T. Ferenci.** 2008. Alkaline phosphatase as a reporter of sigma(S) levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strains. *Arch Microbiol* **189**:43-47.
185. **Spira, B., and E. Yagil.** 1999. The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **38**:80-85.

186. **Steed, P. M., and B. L. Wanner.** 1993. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* **175**:6797-6809.
187. **Stephenson, K., and J. A. Hoch.** 2004. Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms. *Curr Med Chem* **11**:765-773.
188. **Stephenson, K., and J. A. Hoch.** 2002. Two-component and phosphorelay signal-transduction systems as therapeutic targets. *Curr Opin Pharmacol* **2**:507-512.
189. **Stephenson, K., and J. A. Hoch.** 2002. Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther* **93**:293-305.
190. **Stephenson, K., Y. Yamaguchi, and J. A. Hoch.** 2000. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. *J Biol Chem* **275**:38900-38904.
191. **Storz, G., and J. A. Imlay.** 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**:188-194.
192. **Sultan, S. Z., A. J. Silva, and J. A. Benitez.** 2009. The PhoB regulatory system modulates biofilm formation and stress response in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* **302**:22-31.
193. **Sun, G., S. M. Birkey, and F. M. Hulett.** 1996. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**:941-948.
194. **Sunden, F., L. Hakansson, E. Ljunggren, and B. Wullt.** 2006. Bacterial interference--is deliberate colonization with *Escherichia coli* 83972 an alternative treatment for patients with recurrent urinary tract infection? *Int J Antimicrob Agents* **28 Suppl 1**:S26-29.

195. **Surin, B. P., H. Rosenberg, and G. B. Cox.** 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J Bacteriol* **161**:189-198.
196. **Suziedeliene, E., K. Suziedelis, V. Garbenciute, and S. Normark.** 1999. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J Bacteriol* **181**:2084-2093.
197. **Suzuki, S., A. Ferjani, I. Suzuki, and N. Murata.** 2004. The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in *Synechocystis*. *J Biol Chem* **279**:13234-13240.
198. **Szurmant, H., R. A. White, and J. A. Hoch.** 2007. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol* **17**:706-715.
199. **Takemaru, K., M. Mizuno, and Y. Kobayashi.** 1996. A *Bacillus subtilis* gene cluster similar to the *Escherichia coli* phosphate-specific transport (*pst*) operon: evidence for a tandemly arranged *pstB* gene. *Microbiology* **142 (Pt 8)**:2017-2020.
200. **Taschner, N. P., E. Yagil, and B. Spira.** 2004. A differential effect of sigmaS on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**:2985-2992.
201. **Taschner, N. P., E. Yagil, and B. Spira.** 2006. The effect of IHF on sigmaS selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **185**:234-237.
202. **Taylor, P. W., and H. P. Kroll.** 1983. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infect Immun* **39**:122-131.
203. **Thomas, M. R., and E. K. O'Shea.** 2005. An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:9565-9570.
204. **Torres, A., M. D. Juarez, R. Cervantes, and C. Espitia.** 2001. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system

- in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microb Pathog* **30**:289-297.
205. **Valle, J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert, and J. M. Ghigo.** 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12558-12563.
206. **Van Dien, S. J., and J. D. Keasling.** 1998. A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. *J Theor Biol* **190**:37-49.
207. **van Mourik, A., N. M. Bleumink-Pluym, L. van Dijk, J. P. van Putten, and M. M. Wosten.** 2008. Functional analysis of a *Campylobacter jejuni* alkaline phosphatase secreted via the Tat export machinery. *Microbiology* **154**:584-592.
208. **VanBogelen, R. A., E. R. Olson, B. L. Wanner, and F. C. Neidhardt.** 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:4344-4366.
209. **Veide, J., and T. Andlid.** 2006. Improved extracellular phytase activity in *Saccharomyces cerevisiae* by modifications in the PHO system. *Int J Food Microbiol* **108**:60-67.
210. **Verreck, F. A., R. A. Vervenne, I. Kondova, K. W. van Kralingen, E. J. Remarque, G. Braskamp, N. M. van der Werff, A. Kersbergen, T. H. Ottenhoff, P. J. Heidt, S. C. Gilbert, B. Gicquel, A. V. Hill, C. Martin, H. McShane, and A. W. Thomas.** 2009. MVA.85A boosting of BCG and an attenuated, *phoP* deficient *M. tuberculosis* vaccine both show protective efficacy against tuberculosis in rhesus macaques. *PLoS One* **4**:e5264.
211. **von Kruger, W. M., S. Humphreys, and J. M. Ketley.** 1999. A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* **145**:2463-2475.
212. **von Kruger, W. M., L. M. Lery, M. R. Soares, F. S. de Neves-Manta, C. M. Batista e Silva, A. G. Neves-Ferreira, J. Perales, and P. M. Bisch.** 2006. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB*

- mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* **6**:1495-1511.
213. **Wanner, B. L.** 1986. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, p. 1357-1381. *In* R. C. I. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. E. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbrager (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, vol. 1. Washington, D.C.
 214. **Wanner, B. L.** 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 104-128. *In* a. S. Silver, W. William (ed.), Metal ions in gene regulation. Springer, New York.
 215. **Wanner, B. L., and B. D. Chang.** 1987. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**:5569-5574.
 216. **Wanner, B. L., and P. Latterell.** 1980. Mutants affected in alkaline phosphatase, expression: evidence for multiple positive regulators of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Genetics* **96**:353-366.
 217. **Watanabe, T., A. Okada, Y. Gotoh, and R. Utsumi.** 2008. Inhibitors targeting two-component signal transduction. *Adv Exp Med Biol* **631**:229-236.
 218. **Webb, D. C., H. Rosenberg, and G. B. Cox.** 1992. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* **267**:24661-24668.
 219. **Wehmeier, S., A. S. Varghese, S. S. Gurcha, B. Tissot, M. Panico, P. Hitchen, H. R. Morris, G. S. Besra, A. Dell, and M. C. Smith.** 2009. Glycosylation of the phosphate binding protein, PstS, in *Streptomyces coelicolor* by a pathway that resembles protein O-mannosylation in eukaryotes. *Mol Microbiol* **71**:421-433.
 220. **Wellens, A., C. Garofalo, H. Nguyen, N. Van Gerven, R. Slattegard, J. P. Hernalsteens, L. Wyns, S. Oscarson, H. De Greve, S. Hultgren, and J. Bouckaert.** 2008. Intervening with urinary tract infections using anti-

- adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. PLoS One **3**:e2040.
221. **Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **31**:1307-1319.
222. **Whitworth, D. E., and P. J. Cock.** 2009. Evolution of prokaryotic two-component systems: insights from comparative genomics. Amino Acids **37**:459-466.
223. **Whitworth, D. E., A. B. Holmes, A. G. Irvine, D. A. Hodgson, and D. J. Scanlan.** 2008. Phosphate acquisition components of the *Myxococcus xanthus* Pho regulon are regulated by both phosphate availability and development. J Bacteriol **190**:1997-2003.
224. **Willsky, G. R., and M. H. Malamy.** 1980. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. J Bacteriol **144**:356-365.
225. **Wolschendorf, F., M. Mahfoud, and M. Niederweis.** 2007. Porins are required for uptake of phosphates by *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol **189**:2435-2442.
226. **Wosten, M. M., C. T. Parker, A. van Mourik, M. R. Guilhabert, L. van Dijk, and J. P. van Putten.** 2006. The *Campylobacter jejuni* PhosS/PhosR operon represents a non-classical phosphate-sensitive two-component system. Mol Microbiol **62**:278-291.
227. **Wright, G. D., and A. D. Sutherland.** 2007. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria. Trends Mol Med **13**:260-267.
228. **Wu, H., H. Kosaka, J. Kato, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake.** 1999. Cloning and characterization of *Pseudomonas putida* genes encoding the phosphate-specific transport system. J Biosci Bioeng **87**:273-279.
229. **Yamada, M., K. Makino, M. Amemura, H. Shinagawa, and A. Nakata.** 1989. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of

- mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. J Bacteriol **171**:5601-5606.
230. **Yamada, M., K. Makino, H. Shinagawa, and A. Nakata.** 1990. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: properties of *phoR* deletion mutants and subcellular localization of PhoR protein. Mol Gen Genet **220**:366-372.
231. **Yamamoto, K., K. Hirao, T. Oshima, H. Aiba, R. Utsumi, and A. Ishihama.** 2005. Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. J Biol Chem **280**:1448-1456.
232. **Yamane, T., H. Okamura, M. Ikeguchi, Y. Nishimura, and A. Kidera.** 2008. Water-mediated interactions between DNA and PhoB DNA-binding/transactivation domain: NMR-restrained molecular dynamics in explicit water environment. Proteins **71**:1970-1983.
233. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, and T. M. Finan.** 2005. Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Microbiol **58**:877-894.
234. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, and T. M. Finan.** 2006. Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol **188**:1089-1102.
235. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, R. Morton, and T. M. Finan.** 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. Nucleic Acids Res **34**:2686-2697.
236. **Zaborin, A., K. Romanowski, S. Gerdes, C. Holbrook, F. Lepine, J. Long, V. Poroyko, S. P. Diggle, A. Wilke, K. Righetti, I. Morozova, T. Babrowski, D. C. Liu, O. Zaborina, and J. C. Alverdy.** 2009. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Proc Natl Acad Sci U S A **106**:6327-6332.

237. **Zhou, L., G. Grégori, J. M. Blackman, J. P. Robinson, and B. L. Wanner.** 2005. Stochastic activation of the response regulator PhoB by noncognate histidine kinases. *Journal of Integrative Bioinformatics* **2(1):11**.
238. **Zhou, L., X. H. Lei, B. R. Bochner, and B. L. Wanner.** 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J Bacteriol* **185:4956-4972**.
239. **Zundel, C. J., D. C. Capener, and W. R. McCleary.** 1998. Analysis of the conserved acidic residues in the regulatory domain of PhoB. *FEBS Lett* **441:242-246**.