

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude transcriptionnelle d'une souche pathogène aviaire de
Escherichia coli (APEC) et son mutant Pst (phosphate specific
transport)**

par
Sébastien Crépin

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtres ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Février 2008

© Sébastien Crépin, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude transcriptionnelle d'une souche pathogène aviaire de *E. coli* (APEC) et son mutant Pst (phosphate specific transport)

présenté par :
Sébastien Crépin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

J. Daniel Dubreuil, président-rapporteur
Josée Harel, directrice de recherche
Éric Déziel (INRS-Institut Armand-Frappier), membre du jury

Résumé

Les souches pathogènes aviaires (APEC) sont associées aux infections extraintestinales aviaires. L'opéron *pstSCAB-phoU* code pour le système de transport spécifique du phosphate (Pst) et fait partie du régulon Pho. Un système Pst fonctionnel est requis pour la virulence, la résistance au sérum et à l'acidité. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires reliant le régulon Pho et la virulence, nous avons entrepris une étude transcriptomique comparative entre la souche aviaire χ 7122 et son mutant isogénique Pst (K3). Globalement, dans les conditions testées, 471 gènes sont différentiellement exprimés chez la souche K3 par un facteur d'au moins 1,5. En plus de l'induction des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme de diverses sources de phosphate, l'induction de la réponse aux différents stress est observée chez la souche K3. Ainsi, les gènes de la réponse générale au stress ainsi que la réponse stringente sont différentiellement exprimés. L'expression différentielle de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire suggère une modification membranaire. De plus, une proportion similaire des gènes induits et réprimés est impliquée dans la réponse au stress oxydatif et la souche K3 montre une sensibilité accrue aux espèces réactives oxygénées. En accord avec les résultats de biopuces, la souche K3 présente peu de fimbriae à sa surface, agglutine 10-fois moins les levures et ne produit pas FimA. En conclusion, le régulon Pho n'est pas seulement un système régulationnel impliqué dans l'homéostasie du phosphate, mais fait partie d'un réseau complexe impliquant la réponse à différents stress ainsi que la virulence bactérienne.

Mots-clés : *Escherichia coli* pathogène, Régulon Pho, Système Pst, Transcriptomique, Biopuces Affymetrix, Métabolisme bactérien, Réponse aux stress

Abstract

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) are associated with extraintestinal diseases in poultry. The *pstSCAB-phoU* operon belongs to the Pho regulon and encodes the phosphate specific transport system (Pst). A functional Pst system is required for full virulence, resistance to serum, to cationic antimicrobial peptides and acid shock. In an effort to understand effect of *pst* mutation on virulence of the APEC strain χ 7122, we undertook a transcript profiling study of its isogenic Pst mutant (K3) grown in phosphate-rich medium. Overall, 471 genes were differentially expressed by at least 1.5-fold in K3 strain. Interestingly, our results show that the Pst mutant does not only induces systems to optimize the acquisition and the bioavailability of phosphate, but also modulates stress response mechanisms. Indeed, the general and stringent stress responses are the major components of the transcriptome's adjustment to the *pst* mutation. A similar proportion of up- and down-regulated genes was involved in oxidative stress response. In accordance, the K3 strain was less resistant to reactive oxygen species (ROS) than the wild-type strain. Additionally, differential expression of some genes coding for cell surface components suggested membrane modification. In regard to this observation, we showed that the K3 strain had less fimbriae (type 1 and F9) at its surface and agglutinated 10-fold less yeast cells when compared to the APEC strain χ 7122. Altogether, our data confirmed our previous suggestion that the Pho regulon is an important part of a complex network being involved in phosphate homeostasis, stress response and bacterial virulence.

Keywords : Pathogenic *Escherichia coli*, Pho regulon, Pst system, Transcriptome, Affymetrix GeneChip, Bacterial metabolism, Stress response

Table des matières

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xv
SECTION I – Introduction	1
Problématique	2
Recension de littérature	4
1. 1 Les <i>Escherichia coli</i>	5
1.1.1 Caractéristiques générales	5
1.1.2 Les APEC	5
1.2.3 Facteurs associés à la virulence retrouvés chez les APEC	6
1.2.3.1 Les facteurs d'adhésion	7
1.2.3.1.1 Le fimbriae de type 1	7
1.2.3.1.2 Le fimbriae P	8
1.2.3.1.3 Curli	9
1.2.3.1.4 Temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh)	10
1.2.3.1.5 Autres types de fimbriae	11
1.2.3.2 Le plasmide pAPEC-1	12
1.2.3.2.1 Système d'acquisition du Fer	12
1.2.3.2.2 L'aérobactine	13
1.2.3.2.3 Les systèmes Iro et Sit	13
1.2.3.2.4 Colicine-V	13
1.2.3.3 Résistance au sérum	14
1.2.3.4 Les lipopolysaccharides	14
1.2.3.5 La capsule	16
2.1 Le régulon Pho	17

2.1.1 Le phosphate	17
2.1.2 Différentes sources de phosphate.....	17
2.1.3 Transport du P _i par les systèmes Pit et Pst	18
2.1.3.1 Composants des systèmes Pit et Pst	19
2.2. Membres du régulon Pho.....	19
2.2.1 Transduction du signal lors d'une carence en phosphate	21
2.2.2 La protéine senseuse PhoR	21
2.2.3 La protéine régulatrice PhoB.....	21
2.2.4 Complexe d'activation du régulon Pho	22
2.3 Phénotypes associés à l'activité du régulon Pho.....	22
2.3.1 Régulon Pho, réponse générale au stress et réponse stringente	27
2.3.1.2 La réponse générale au stress	27
2.3.1.3 Réponse stringente	28
2.3.2 Modification des composants membranaires	29
2.3.3 Formation des biofilms	30
2.3.4 Résistance au stress oxydatif.....	31
2.3.5 Le système Pst et la virulence.....	32
2.3.6 PhoBR et la virulence	33
2.4 Études transcriptomiques et protéomiques du régulon Pho	36
2.4.1 La transcriptomique	36
2.4.2 La protéomique.....	41
2.4.3 Généralités des études transcriptomiques et protéomiques du régulon Pho.....	42
2.4.3.1 <i>Escherichia coli</i>	42
2.4.3.2 <i>Bacillus subtilis</i>	43
2.4.3.3 <i>Bacillus licheniformis</i>	45
2.4.3.4 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	45
2.4.3.5 <i>Streptomyces coelicolor</i>	46
2.4.3.6 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	46
2.4.3.7 <i>Vibrio cholerae</i>	47
SECTION II - Méthodologie et Résultats	48
Article	49
Implication de l'auteur dans cet article	50

Genome-wide transcriptional response of an Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> (APEC) Pst Mutant	51
Abstract	52
Introduction.....	53
Materials and Methods	54
Bacterial strains, media and growth condition	54
Alkaline phosphatase assay.....	54
RNA isolation.....	54
cDNA synthesis and biotinylation.....	55
DNA microarray hybridization and analysis.....	55
qRT-PCR.....	56
<i>In silico</i> search for Pho box(es).....	56
Sensitivity of <i>E. coli</i> strains to reactive oxygen intermediate (ROI)- generating agents	57
Yeast cell aggregation assay	57
Western blotting.....	57
Electronic microscopy.....	58
Microarray accession numbers	58
Results and Discussion	58
Microarray design to identify differentially expressed genes in APEC <i>pst</i> mutant.....	58
Significant changes in K3 <i>pst</i> mutant	59
Validation of microarray results by qRT-PCR.....	60
Global stress response	60
Transport and binding proteins	61
Energy metabolism	61
Protein fate and synthesis genes	62
RpoS in <i>pst</i> mutant	63
Oxidative stress response.....	63
Acid stress response	65
Cell membrane components	66
LPS.....	66
The type-1 fimbriae production is diminished in <i>pst</i> mutant.....	67
Conclusion.....	68

Acknowledgements.....	68
Bibliography.....	69
Figures and Tables.....	74
SECTION III – Discussion	86
3.1 Effet de la mutation <i>pstCAB</i> sur la réponse transcriptionnelle	87
3.2 Validation des résultats des biopuces à ADN à l'aide du qRT-PCR	88
3.3 Transport de l'arginine, glutamine et des oligopeptides.....	89
3.4 Métabolisme énergétique.....	89
3.5 Système de chaperonnes et synthèse protéique.....	90
3.6 Le régulon Pho, la réponse générale au stress et la réponse stringente ..	90
3.7 Composants membranaires	91
3.8 Résistance à l'acidité	92
3.9 La résistance au stress oxydatif.....	93
3.10 Biosynthèse des fimbriae de type 1 et F9	94
3.11 Alternative aux antibiotiques	96
3.12 Conclusions	97
3.12 Perspectives	98
SECTION IV – Bibliographie	100

Liste des tableaux

SECTION I – Recension de littérature

Tableau I : Gènes composant le régulon Pho	24
Tableau II : Phénotypes retrouvés lorsque le régulon Pho est actif.....	26
Tableau III : Identification des gènes exprimés <i>in vivo</i> dépendant de PhoB à l'aide de modèles d'infections	34
Tableau IV : Étude de la réponse globale à un milieu carencé en phosphate à l'aide de la technologie transcriptomique et protéomique.....	38

SECTION II – Méthodologie et résultats

Table I: Up-regulated genes in the K3 strain.....	75
Table II: Down-regulated genes in the K3 strain	78
Table III : Genes used for microarray validation with qRT-PCR.....	81
Table IV : Sensitivity of APEC χ 7122 and K3 (<i>pst</i> mutant) to oxidative stress generating compounds	82

Liste des figures

SECTION I – Recension de littérature

Figure 1 : Quelques facteurs associés à la virulence retrouvés chez les ExPEC et plus précisément chez les APEC.....	7
Figure 2 : Unité transcriptionnelle et schématisation du fimbriae de type 1.....	9
Figure 3 : Représentation de l'enveloppe cellulaire de <i>E. coli</i> K12.....	15
Figure 4 : Contrôle transcriptionnel du régulon Pho et transduction transmembranaire du signal par le phosphate inorganique (P _i) environnemental ..	23
Figure 5 : Relation entre la réponse stringente, la réponse générale au stress et le régulon Pho.....	29
Figure 6 : Schématisation de l'approche expérimentale employée dans l'utilisation de la technologie des biopuce à ADN	41

SECTION II – Méthodologie et résultats

Figure 1 : Functional classification of the differentially expressed genes	83
Figure 2 : Microarray results validation by qRT-PCR	84
Figure 3 : Production of type 1 and F9 fimbriae by the K3 strain.....	85

Liste des sigles et abréviations

a.a.	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFI	Acid fitness island : Îlot de résistance à l'acidité
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Antigène H	Antigène flagellaire
Antigène K	Antigène capsulaire
Antigène O	Antigène oligosaccharidique
APEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> pathogène aviaire
ATP	Adénosine triphosphate
bp	Base pair : Paire de base
CAM	Complexe d'attaque membranaire du complément
Cm	Chloramphénicol
ColV	Colicine-V
C-P	Pont carbone-phosphate
Ct	Threshold cycle : Cycle seuil
Cu	Cuivre
DFI	Differential fluorescence induction : Induction de fluorescence différentielle
EB	Algorithme de Wright et Simon
ECA	Enterobacterial common antigen : Antigène commun aux entérobactéries
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EMSA	Electrophoretic mobility shift assays : Électrophorèse de retard sur gel
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> entéropathogène
ExPEC	<i>Extraintestinal pathogenic E. coli</i> : <i>E. coli</i> pathogène extraintestinal
Fe	Fer
FDR	False discovery rate : Taux de découverte des faux positifs
FPM	Force proton motrice
G3P	Glycérol-3-phosphate

GbO3	Globotriasylcéramide
GbO4	Globoside
GbO5	Antigène de Forsmann
GFP	Green fluorescent protein : Protéine fluorescente verte
IVET	<i>In vivo</i> expression technology : Technologie d'expression <i>in vivo</i>
Kan	Kanamycine
KDO	Acide 3-déoxy-d-manno-oct-2-ulosonique
K _{LPS}	Antigènes capsulaires liés aux LPS
L-Ara4N	4-amino-4-déoxy-L-arabinose
LB	Lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharides
MAC	Membrane complex attack : Complexe d'attaque membranaire
MEC	Matrice extracellulaire
MENEC	<i>Meningitidis-associated E. coli</i> : <i>E. coli</i> causant des méningites
MI	Membrane interne
ME	Membrane externe
Nal	Acide nalidixique
Nt	Nucléotide
ORF	Open reading frame : Cadre de lecture ouvert
PCR	Polymerase chain reaction : Réaction de polymérase en chaîne
PES	Phénazine éthosulfate
PMS	Phénazine méthosulfate
ppGpp	Guanosine tétraphosphate
P _i	Phosphate inorganique
PolyP _i	Métaphosphate
PP _i	Pyrophosphate
Pap	Pyelonephritis-associated pili : pili associé aux pyélonéphrites
PEP	Phosphoénolpyruvate
Phn	Système de transport et de métabolisme des phosphonates
Pst	Système de transport spécifique du phosphate
PTS	Carbohydrate phosphotransferase system : Système phosphotransférase pour les hydrates de carbone
qRT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction : Réaction de polymérase quantitative en temps réel en chaîne

RMA	Robust multiarray average algorithm : Algorithme robuste comparant les moyennes des biopuces à ADN
ROS	Reactive oxygen species : Espèces réactives oxygénées
RNS	Reactive nitrogen species : Espèces réactives nitrogénées
SCOTS	Selective capture of transcribed sequences: Capture sélective des séquences transcrites
SEPEC	Septicemic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> septicémique
sRNA	Small regulatory RNA: Petit ARN régulateur
STAT	Transduction du signal et activateur de la transcription
TCRS	Two-component regulatory system : Système de regulation à deux composants
Tsh	Temperature-sensitive hemagglutinin : Hémagglutinine sensible à la température
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> uropathogène
XP	Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate

Unité de mesure

g	Gramme
K_d	Constante de dissociation
K_m	Constante de Michaelis-Menten
M	Molaire
mg	Milligramme
nm	Nanomètre
O.D.	Optical density : Densité optique
μM	Micromolaire (10^{-6} molaire)
V_{max}	Vitesse maximale
U	Unité

Symbole

α	Alpha
↑	Augmentation
β	Beta

χ	Chi
\downarrow	Diminution
σ	Sigma
\geq	Plus grand ou égal

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes plus sincères remerciements au Dre Josée Harel pour m'avoir donné la chance de poursuivre mes études de deuxième cycle dans son laboratoire. Malgré le fait que ce fut extrêmement long avant d'obtenir des ARNs de qualité afin d'effectuer les expériences de microarray, elle n'a jamais cessé de croire en moi et m'a toujours soutenu. Ses conseils et sa qualité scientifique ont fait de cette maîtrise une réussite.

De plus, je tiens à remercier le Dr Charles M. Dozois pour tous ses conseils et les expériences complémentaires qui ont été effectuées dans son laboratoire.

Je tiens aussi à remercier le Dr Martin G. Lamarche pour ses précieux conseils expérimentaux. Mes remerciements s'adressent aussi au Dr Guillaume Bruant pour son aide technique avec les expériences de microarray. Sans son aide, l'analyse des résultats auraient été un enfer. Les discussions n'ayant aucun caractère scientifique, autour d'une ou de plusieurs bières, ont fait de ces deux personnes des amis.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du laboratoire du Dr Harel pour leurs conseils et leur support au cours de ces deux années et plus particulièrement à M. Richard Graveline d'avoir tendu l'oreille lorsque j'avais de la frustration à évacuer et à M. Philippe Garneau pour son expertise en bioinformatique. Je tiens aussi à remercier Mme Miria Élias de l'Institut de Recherche en Biotechnologie de m'avoir expliqué et initié à la technologie du Bioanalyzer.

Merci aux étudiants, techniciens et chercheurs du GREMIP, présents et passés, à qui j'ai volé temps, conseils et enzymes...

Je remercie mes ami(e)s et plus particulièrement mes parents et mon frère pour leur support tout au cours de mes études. Je dis aussi mille merci à ma copine, Marie-Ève, d'avoir été si patiente, d'avoir enduré mes longues périodes passées devant mon ordinateur ainsi qu'avoir été présente lors de mes moments de stress et de panique. Ma belle, MERCI.

Finalement, je tiens à remercier les organismes subventionnaires pour leur support financier, la faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal ainsi que la Cité de Biotechnologie de St-Hyacinthe.

SECTION I - Introduction

Problématique

En plus de faire partie de la flore bactérienne de l'hôte, les bactéries telles que *Escherichia coli* sont aussi impliquées dans plusieurs infections. Celles-ci peuvent être de type intestinal ou de type extraintestinal (ExPEC). Les diarrhées sont particulièrement associées aux infections intestinales tandis que les infections du tractus urinaire, de méningites et de septicémies sont plus spécifiquement associées aux ExPECs. Dans ce dernier groupe, nous retrouvons aussi les *E. coli* causant des infections chez la volaille (APEC). Les APEC sont associées à la colibacillose aviaire et sont la cause de l'inflammation des sacs aériens, de péricardite, de périhépatite, de péritonite, d'entérite et de septicémie mortelle.

Depuis quelques années, une attention particulière fut portée aux APEC puisque ce groupe d'*E. coli* possède des caractéristiques des souches d'*E. coli* causant des infections urinaire (UPEC) chez l'homme. Ainsi, plus de 80% des cadres ouverts de lecture sont communs aux deux groupes. Entre autre, ces groupes partagent sensiblement les mêmes facteurs de virulence, i.e. les gènes de fimbriae, de capsule, de protéines de la membrane externe, de la « Temperature-sensitive hemagglutinin » (Tsh), les systèmes d'acquisition du fer ainsi que des plasmides de type colicine. Donc, les APEC représentent un haut risque de zoonose.

Le phosphate est un élément essentiel pour les cellules puisqu'il entre dans la composition d'une multitude de biomolécules, dont les acides nucléiques et les lipides membranaires, en plus d'être impliqué dans la transduction des signaux. L'opéron *pstSCAB-phoU* code pour le système spécifique du transport du phosphate (système Pst) et fait partie du régulon Pho. Le régulon Pho est composé d'au moins 47 gènes impliqués dans le transport et le métabolisme de diverses sources de phosphate lorsque ce dernier est limité. Il est régulé par le système à deux composants PhoBR. Ainsi, en condition de carence en phosphate, PhoBR s'active et entraîne l'induction ou la répression des gènes appartenant au régulon Pho. De plus, une mutation du système Pst active constitutivement le régulon Pho et ce, indépendamment de la concentration du milieu extracellulaire en phosphate. De cette manière, la mutation du système Pst mime un état de carence en phosphate.

Une carence en phosphate entraîne une réponse pléiotropique et atténue la virulence et ce, chez diverses espèces bactériennes. Cependant, les mécanismes moléculaires reliant l'activation du régulon Pho (carence en phosphate) et la virulence ne sont pas connus. Afin de comprendre et d'identifier les voies métaboliques influencées par le régulon Pho, nous avons entrepris une étude transcriptomique comparative globale entre la souche APEC χ 7122 et son mutant isogénique Pst (K3). En d'autres termes, nous avons comparé la réponse transcriptionnelle d'une souche pathogène entre un état d'activation (K3) et de répression (χ 7122) du régulon Pho.

SECTION I – Recension de littérature

1.1 Les *Escherichia coli*

1.1.1 Caractéristiques générales

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe plusieurs espèces bactériennes dont les *Escherichia coli*, les *Salmonella*, les *Shigella* et les *Klebsiella*. Le type *E. coli* se caractérise par une forme de bacille, une coloration de Gram négative, une respiration de type anaérobie facultative et par la présence de flagelles péritriches. Il existe plusieurs souches de *E. coli*, qui sont classées de façon sérologique selon trois antigènes de surface, à savoir lipopolysaccharidique (antigène O), capsulaire (antigène K) et flagellaire (antigène H). Il existe deux types d'*E. coli*, les souches commensales et les souches pathogènes. Les souches commensales colonisent le tube digestif et font partie de la flore intestinale, autant chez les animaux que chez l'homme. Pour sa part, le groupe des pathogènes est divisé en deux sous-catégories, les *E. coli* causant des infections intestinales et celles causant des infections extraintestinales. Seul ce dernier groupe sera décrit puisqu'il fait partie intégrante de ce mémoire.

Le groupe des *E. coli* associées aux infections extraintestinales se nomme ExPEC, pour Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. De ce groupe, notons la présence des souches associées aux méningites néonatales (MENEK), aux septicémies (SEPEC) ainsi qu'aux infections du tractus urinaire (UPEC). De plus, plusieurs souches causant des infections aviaires (APEC) se retrouvent dans le groupe des ExPEC. Puisque le sujet de ce mémoire concerne plus précisément le groupe des APEC, une description détaillée de son processus infectieux et des facteurs associés à la virulence sera effectuée au cours des prochaines sections.

1.1.2 Les APEC

La contamination de la volaille par les APEC s'effectue principalement par transmission fécale-orale et par conséquent, par voie aérosol. De cette manière, une primo-infection s'installe au niveau du tractus respiratoire de la volaille. Suite à cette

primo-infection, il s'établit une infection systémique, qui peut mener à la mort. Les APEC sont une cause étiologique d'inflammation des sacs aériens, de péricardite, de périhépatite, de péritonite, d'entérite et mène à une septicémie mortelle [1, 2]. Ainsi, les infections causées par les APEC entraînent d'énormes pertes économiques à l'industrie avicole. Citons, par exemple, une étude effectuée par Yogaratnam qui, en 1995, a révélé que 43 % des carcasses de poulet destinées au domaine de la rôtisserie ont dû être incinérées en raison de la présence de lésions colisepticémiques (lésions causées par les APEC) [3].

Plusieurs sérogroupes sont associés aux infections causées par les APEC. Les plus importants sont les sérogroupes O1 :K1, O2 :K2 ainsi que O78 :K80 [1, 4-7]. En plus de causer des infections aviaires, le sérotype O78 peut infecter les moutons ainsi que les humains [8, 9], ce qui en fait un sérotype présentant un haut risque de zoonose. Récemment, le génome de la souche APEC O1:K1:H7 a été séquencé et annoté [10]. La comparaison du génome de cette souche aviaire avec les souches ExPEC humaines CFT073, UTI89 et UTI536 montre une très forte similarité entre ces groupes [10, 11]. Ainsi, que 14,3% des cadres ouverts de lecture (ORFs) du génome de O1:K1:H7, incluant son chromosome et ses quatre plasmides, sont spécifiques à cette souche [10]. Étant donné la très forte similitude entre les gènes des APEC et des ExPEC humaines, les APEC peuvent être considérées comme des agents présentant un haut risque de zoonose [8, 12].

1.2.3 Facteurs associés à la virulence retrouvés chez les APEC

Les facteurs associés à la virulence retrouvés chez les APEC comportent les facteurs d'adhésion (fimbriae de type 1, P, F9 ainsi que les curlis), le plasmide pAPEC-1, les polysaccharides de surface (capsule et lipopolysaccharides), la résistance au sérum, les protéines de la membrane externe, les flagelles, les toxines ainsi que des facteurs inconnus (Fig. 1). Étant donné le nombre important de facteurs de virulence, les plus fréquemment rencontrés seront discutés. Ce chapitre portera donc sur les principales caractéristiques de ces facteurs associés à la virulence ainsi que sur leur contribution à l'élaboration d'une l'infection.

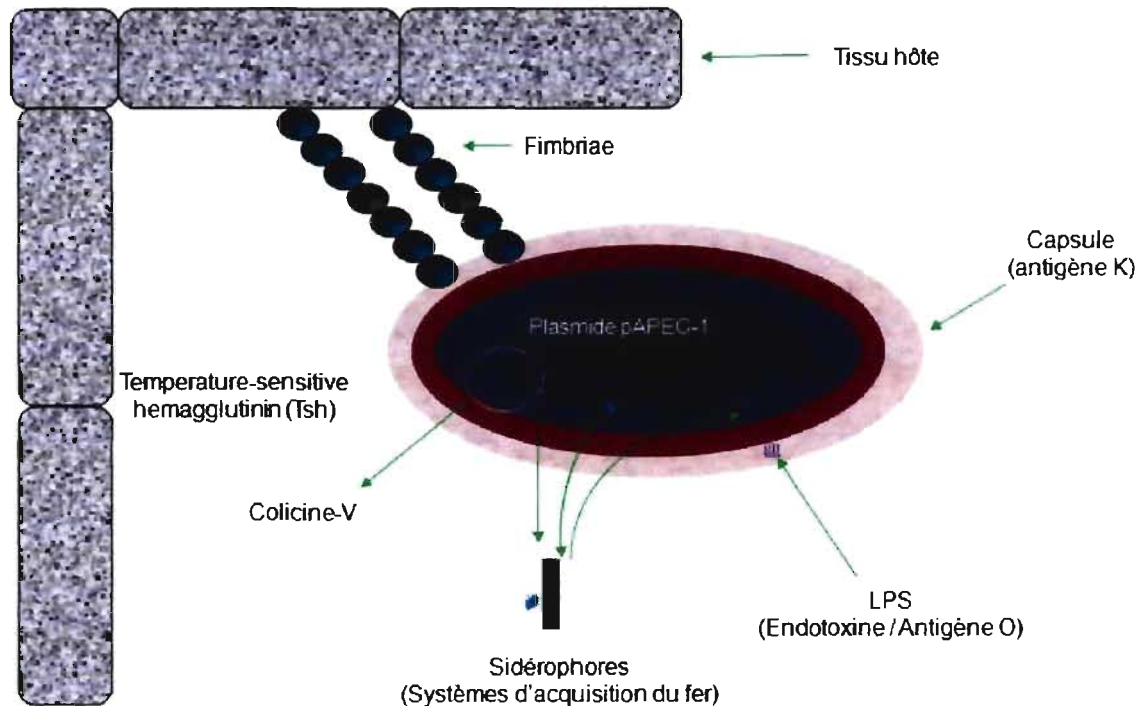


Figure 1. Quelques facteurs associés à la virulence retrouvés chez les ExPEC et plus précisément chez les APEC (Figure adaptée de la réf. [13]). Schématisation des différents facteurs de virulence retrouvés chez les APEC. Ceux-ci concernent les fimbriae, le plasmide pAPEC-1 [qui code, entre autre, pour la protéine Tsh, la colicine-V et des systèmes d'acquisition du fer (sidérophores)], les LPS ainsi que la capsule. Pour de plus amples détails, se référer au texte.

1.2.3 Les facteurs d'adhésion

1.2.3.1.1 Le fimbriae de type 1

La plupart des APEC, tout comme les ExPEC et les souches commensales, expriment le fimbriae de type 1 [2, 14, 15]. Ce fimbriae est codé par l'opéron *fimAICDFGH* et renferme des protéines impliquées dans la biosynthèse et la structure du fimbriae (Fig. 2 à la page 9). Ce dernier est composé de plusieurs sous-unités protéiques ancrées, à sa base, à la membrane externe. Il se présente sous la forme d'une tige filamenteuse ressemblant à de la ficelle, possédant un diamètre d'environ 7 nanomètres (nm) et une longueur de 0,1 à 2 micromètres (μM) [16-18]. Le fimbriae de type 1 est majoritairement formé par la sous-unité FimA. L'adhérence au niveau de son récepteur est médiée par la sous-unité FimH, située à l'extrémité distale du fimbriae [17, 19-21]. Cette adhésion s'effectue au niveau des récepteurs glycoprotéiques contenant des résidus D-mannose retrouvés au niveau des cellules

eucaryotes et plus particulièrement, au niveau de l'épithélium de la vessie, de l'intestin, des poumons, des reins ainsi que sur les cellules inflammatoires [2, 22-24]. De plus, le fimbriae de type 1 peut se fixer à différents composants de la matrice extracellulaire (MEC), dont la laminine, la fibronectine, le collagène ainsi que sur des surfaces abiotiques [25-27].

Étant donné que l'adhésion au tissu hôte est une étape clé dans l'instauration d'une infection, le fimbriae de type 1 est impliqué dans cette étape. Ainsi, chez les UPEC, le fimbriae de type 1 est impliqué dans la colonisation de la vessie, le site primaire d'infection, et est associé aux cas de cystites [28]. En plus de son rôle d'adhésine, le fimbriae de type 1 est impliqué dans l'invasion du tractus urinaire, ce qui permet à la bactérie d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte [24, 29]. Il est aussi impliqué dans la formation des biofilms [27], ce qui permet aux UPEC de résister à l'antibiothérapie, en plus de déjouer les défenses de l'hôte [25]. Chez les APEC, le fimbriae de type 1 est exprimé dans la trachée, les sacs aériens et les poumons [30, 31]. Puisque le tractus respiratoire supérieur est le site primaire d'infection des APEC, le fimbriae de type 1, autant chez les UPEC que chez les APEC, est impliqué dans l'instauration de l'infection.

1.2.3.1.2 Le fimbriae P

Le fimbriae Pap (fimbriae P) est codé par un groupe de 11 gènes, les gènes *papIBAHCDJKEFG*. Son nom provient de « pyelonephritis-associated pili ». Le fimbriae P est associé aux UPEC et plus précisément, à la pyélonéphrite [32]. Ce fimbriae est similaire au fimbriae de type 1, c'est-à-dire qu'il forme une tige protéique de 6,8 nm de largeur, est constitué d'une sous-unité majeure (PapA) ainsi que d'une adhésine (PapG) retrouvée à l'extrémité distale du fimbriae [33, 34]. Ses récepteurs sont le globotriasylcéramide (GbO3), le globoside (GbO4) et l'antigène de Forssmann (GbO5). Ceux-ci se retrouvent au niveau des glycolipides membranaires du groupe P des érythrocytes humains ainsi qu'au niveau des cellules uroépithéliales [19, 20, 25, 32, 35].

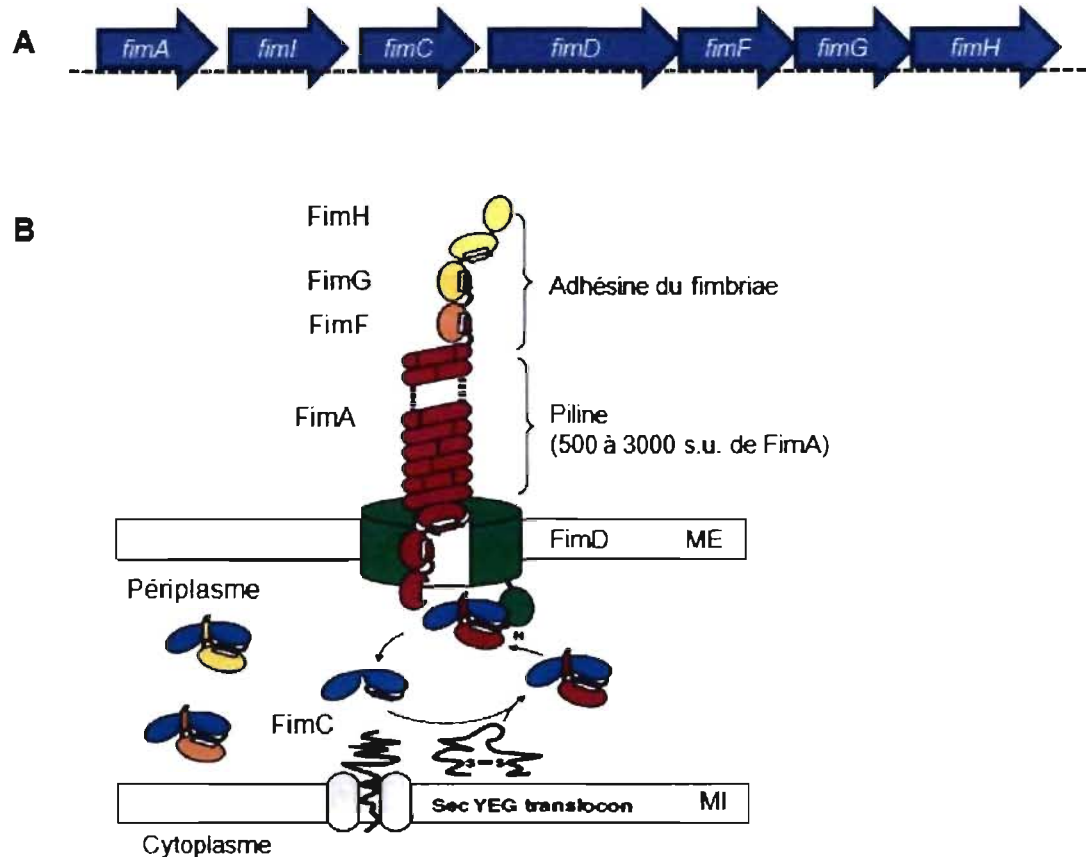


Figure 2. Unité transcriptionnelle et schématisation du fimbriae de type 1 [Figure tirée de la réf. [36]]. Organisation génétique (A) et structurale (B) du fimbriae de type 1. Le gène *fimA* code pour la sous-unité majeure du fimbriae (nommée piline) et connecte l'extrémité distale (FimFGH) du fimbriae à la membrane externe. Pour sa part, le gène *fimH* code pour l'adhésine du fimbriae et permet l'adhésion à des résidus D-mannose retrouvés au niveau des récepteurs des cellules de l'hôte. Abréviations: s.u., sous-unité; ME, membrane externe; MI, membrane interne.

Chez les UPEC, contrairement au fimbriae de type 1, le fimbriae P n'est pas exprimé au niveau de la vessie, mais plutôt au niveau des reins. Il est impliqué dans les cas sévères d'infection urinaire (pyélonéphrite) puisqu'il permet l'adhérence bactérienne au niveau des cellules rénales [25, 32]. Chez les APEC, le fimbriae P ne semble pas être impliqué dans l'adhésion au tractus respiratoire, mais plutôt dans la colonisation des organes systémiques [31, 37, 38]. De cette manière, chez les APEC, le fimbriae P est impliqué dans le développement des septicémies.

1.2.3.1.3 Curli

La très forte majorité des *E. coli* possède des curli [2]. Ils se présentent comme étant des appendices ressemblant à des cheveux, minces et en forme de rouleau [39].

Les curli sont codés par deux opérons génétiquement opposés, *csgBAC* et *csgDEF*. Le gène *csgA* code pour la sous-unité fimbriaire tandis que le gène *csgB* code une protéine essentielle à la biosynthèse des curli [40]. Le rôle des curli dans la virulence bactérienne n'est pas très bien connu. Cependant, il a été mis en évidence qu'ils peuvent adhérer à plusieurs protéines de l'hôte, incluant la fibronectine et la laminine de la matrice extracellulaire [39-41]. Différentes études effectuées chez les APEC ont permis de déterminer que les curli sont impliqués dans la colonisation, l'invasion et la persistance chez l'hôte [9, 15, 42, 43]. De plus, les curli sont impliqués dans la formation de biofilms [40]. En conclusion, les curli permettent l'adhérence au tissu hôte et donc, la colonisation de ce dernier.

1.2.3.1.4 Temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh)

La « temperature-sensitive hemagglutinin » (Tsh) est une adhésine faisant partie de la famille des autotransporteurs [44]. Les autotransporteurs appartiennent au système de sécrétion de type 5 et sont synthétisés sous forme de protéine précurseure comprenant trois domaines; le domaine N-terminal contenant la séquence signal, le domaine passager (portant le domaine fonctionnel de la protéine) ainsi que le domaine C-terminal codant le domaine β . Suite à son passage au-travers de la membrane interne, par le système de sécrétion Sec, la séquence signal est clivée et la protéine est relâchée au niveau du périplasme. Par la suite, le domaine β s'insère au niveau de la membrane externe, ce qui forme un pore. Avec l'aide du domaine β , le domaine passager est sécrété au niveau de la surface bactérienne. Le domaine passager peut, dans ce cas, demeurer fixé à la bactérie ou être relâché dans le milieu extracellulaire [45].

La Tsh est fortement conservée chez les UPEC et les APEC [46-48]. Elle a, initialement, été caractérisée comme étant impliquée dans l'adhésion bactérienne au niveau des érythrocytes aviaire [49]. Elle est aussi impliquée dans la virulence, l'adhésion à la matrice extracellulaire (collagène de type IV et à la fibronectine) ainsi qu'à l'hémoglobine, ce qui en fait un facteur d'adhésion et donc, de virulence [46, 50]. Des études sont toujours en cours afin de déterminer son rôle précis dans la virulence des APEC.

1.2.3.1.5 Autres types de fimbriae

Les APEC possèdent d'autres types de fimbriae, dont les fimbriae F1C, Stg et F9. Le fimbriae F1C est codé par les gènes *foc* et ressemble, génétiquement et structurellement, au fimbriae de type 1 [51-53]. Il permet l'adhésion au niveau des résidus glycolipidiques β -GalNac-1 et 4β -Gal, retrouvés au niveau des cellules endothéliales de la vessie ainsi qu'au niveau des tubules distaux et des tubes collecteurs rénaux [25, 54]. De plus, son adhésion peut s'effectuer au niveau des récepteurs globotriasylcéramide, qui eux se retrouvent exclusivement au niveau rénal [55]. De cette manière, le fimbriae F1C est impliqué dans la colonisation du tractus urinaire.

De son côté, le fimbriae Stg est codé par l'opéron *stgABCD* et a été récemment identifié chez la souche APEC χ 7122. *In vitro*, l'expression de ce fimbriae permet l'adhérence au niveau des cellules intestinales et urothéliales, chez l'humain, ainsi qu'au niveau de cellules pulmonaires aviaire. *In vivo*, ce fimbriae est impliqué dans la colonisation des sacs aériens du poulet [56]. Cependant, le récepteur précis de ce fimbriae, tout comme les conditions environnementales menant à son expression ne sont pas connus. Ainsi, le fimbriae Stg est impliqué dans la colonisation du tractus respiratoire et donc, dans l'établissement de l'infection primaire.

Le fimbriae F9 est codé par un groupe de six gènes regroupés en quatre unités transcriptomiques, les gènes *c1936*, *c1935*, *ydeQ* et l'opéron *ydeTSR*. Il est homologue au fimbriae de type 1 et F1C et est retrouvé chez plusieurs souches pathogènes de *E. coli*, tandis que les souches commensales en possèdent une forme tronquée [57, 58]. Récemment, il a été mis en évidence que le fimbriae F9 est exprimé dans l'urine, joue un rôle dans la virulence chez le veau et est impliqué dans l'adhérence au niveau des cellules épithéliales de poumon [57, 59-61]. De plus, le fimbriae F9, tout comme celui de type 1, est impliqué dans la formation de biofilm [58, 62]. Cependant, le récepteur du fimbriae F9 est, à ce jour, inconnu. Finalement, des expériences transcriptomiques menées dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence la présence du fimbriae F9 chez la souche χ 7122. Par contre, son rôle dans la virulence chez le poulet n'a pas encore été élucidé.

Comme nous pouvons le constater, les APEC possèdent plusieurs adhésines, ce qui leur permet d'adhérer à différents récepteurs localisés dans différentes niches chez l'hôte. Cela leur confère un avantage puisque l'expression séquentielle des facteurs d'adhérence permet la colonisation des différentes niches et donc, permet l'établissement d'une infection systémique.

1.2.3.2 Le plasmide pAPEC-1

Le plasmide pAPEC-1 est de type colicine-V et contient, notamment, les gènes codant pour la Tsh, les systèmes d'acquisition du fer tels que l'aérobactine, Iro et Sit ainsi que la colicine-V.

1.2.3.2.1 Système d'acquisition du Fer

Le fer est un élément essentiel à la vie de tout organisme. Il est utilisé dans le transport et l'entreposage de l'oxygène, dans la biosynthèse de l'ADN, le transport des électrons (respiration cellulaire) et dans le métabolisme du peroxyde. Les besoins en fer chez les bactéries se situent aux environs de 10^{-7} M. Cependant, chez l'hôte, la concentration en fer du milieu extracellulaire est d'environ 10^{-24} M puisqu'il est associé à la transferrine, la lactoferrine, l'haptoglobine et l'hémoglobine [63]. Pour contrer cette carence et subvenir à leurs besoins, les bactéries possèdent des mécanismes de séquestration du fer. Ces mécanismes passent notamment par les sidérophores et les hémophores. Ces deux systèmes se ressemblent à tout point de vue, à l'exception de la molécule liée à ceux-ci (fer pour les sidérophores et hème pour les hémophores). Par exemple, les sidérophores séquestreront aux protéines de l'hôte, telle la transferrine, le fer associé à cette dernière. Pour que le fer soit utilisable par les bactéries, celles-ci possèdent, au niveau de leur membrane, des récepteurs de sidérophores, ce qui permet la fixation du complexe sidérophore-fer. Suite à cette fixation, le fer sera transporté au niveau du cytoplasme et utilisé par différents systèmes. Puisque les systèmes d'acquisitions du fer sont essentiels à la survie bactérienne, ces mécanismes sont donc considérés comme des facteurs associés à la virulence.

1.2.3.2.2 L'aérobactine

L'aérobactine, un sidérophore de type hydroxamate, est considérée comme étant un important facteur de virulence chez les ExPEC [64-67]. Elle possède une très faible constante d'affinité pour le fer, est soluble, stable et recyclable. En plus de livrer le fer de façon très spécifique, ce sidérophore est produit seulement lorsque le fer se trouve à de très faibles concentrations [68]. Génétiquement, l'aérobactine est codée par l'opéron *iucABCD-iutA*, où les gènes *iuc* sont impliqués dans sa biosynthèse, tandis que le gène *iutA* code pour son récepteur membranaire [69-72].

1.2.3.2.3 Les systèmes Iro et Sit

Le système Iro est codé par le locus *iroBCDEN* et est homologue à celui de *Salmonella enterica* [73-75]. Ce système code pour un récepteur de sidérophores de type catécholate dont fait partie, entre autre, l'entérocholine [73, 74]. De plus, le système Iro est impliqué dans la virulence [75-78]. Pour sa part, le système Sit est codé par l'opéron *sitABCD*. Ce transporteur est retrouvé chez plusieurs espèces pathogènes d'*E. coli* ainsi que chez d'autres entérobactéries pathogènes [79-84]. Il est impliqué dans le transport du fer, du manganèse ainsi que dans la résistance au stress oxydatif.

1.2.3.2.4 Colicine-V

La colicine-V (CoIV) fait partie de la famille des colicines. Les colicines codent pour des toxines de faible poids moléculaire et sont actives contre les espèces bactériennes phylogénétiquement reliées à celles les produisant [85]. La colicine-V est codée par différents gènes, un structural (*cvaC*), un système d'export (*cvaA* et *cvaB*) ainsi qu'un conférant l'immunité (*cvi*) [86, 87]. De cette manière, la protéine d'immunité confère, aux bactéries la produisant, une protection contre CoIV [85, 88, 89]. De plus, CoIV est sécrétée au niveau du milieu extracellulaire sous l'action des protéines d'export CvaA et CvaB ainsi que de la porine TolC [90]. Chez les cellules cibles, les colicines se fixeront à différents types de récepteurs membranaires et plus précisément, au niveau du système d'import des complexes sidérophore-fer TonB-dépendent, composé des protéines ExbB/D et TonB ainsi qu'au niveau du système

Tol-Pal [91], composé des protéines YbgC-YbgF-TolQ-R-A-B-Pal et impliqué dans le maintien de l'intégrité membranaire [92]. L'interaction colicine-récepteur mène, entre autre, à la formation de pores au niveau de la membrane interne, la dégradation de l'ADN et l'inhibition de la biosynthèse des lipopolysaccharides, ce qui mène à la mort bactérienne [88, 93].

1.2.3.3 Résistance au sérum

Étant donné que les polysaccharides de surface (LPS et capsule) et la résistance au sérum sont étroitement liés, nous allons donc discuter de ces aspects au cours de ce chapitre.

Les souches ExPEC sont souvent associées à la résistance à l'effet bactéricide du sérum [94]. Cette résistance est conférée par des structures retrouvées au niveau de la surface bactérienne qui empêchent, notamment, l'interaction des peptides antimicrobiens aux structures de la surface bactérienne et interfère avec la formation, l'attachement et/ou l'activation du complexe d'attaque membranaire (MAC) du complément. Le MAC forme des pores membranaires, ce qui entraîne un déséquilibre du potentiel électrochimique et mène à la mort bactérienne [95]. *E. coli* résiste à l'effet bactéricide du sérum, par ses LPS, protéines de membrane externe et sa capsule.

1.2.3.4 Les lipopolysaccharides

Les LPS se retrouvent uniquement au niveau du feuillet externe de la membrane externe. Ils sont impliqués dans la perméabilité membranaire, la résistance au système immunitaire de l'hôte et possèdent une activité antigénique et endotoxique. Ils sont constitués de trois portions, le lipide A (endotoxine), le cœur oligosaccharidique et l'antigène O (Fig. 3). Le lipide A, portion hydrophobe des LPS, est un saccharolipide (acide gras fixé à un sucre) à base de glucosamine composant la monocouche externe de la membrane externe de la plupart des bactéries à coloration de Gram négative. Il est responsable de l'endotoxicité induite par ces bactéries et permet l'ancrage des LPS au niveau de la membrane externe. De plus,

le lipide A est essentiel à la croissance des bactéries à coloration de Gram négative [96-99]. Pour sa part, le cœur oligosaccharidique est composé d'acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (Kdo) et d'heptoses et permet l'ancrage de l'antigène O au lipide A [98, 99]. L'antigène O, lui, se retrouve à l'extrémité distale des LPS. Il est constitué de chaînes oligosaccharidiques qui varient en longueur et en composition [99]. Pour permettre sa survie chez l'hôte, la bactérie modifie la composition de ses LPS. De cette manière, l'ajout de palmitate, de 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) et/ou de phosphoéthanolamine, au niveau du lipide A, permet la résistance aux peptides antimicrobiens retrouvés dans le sérum [100-103]. Cette résistance est conférée par un changement de charge des LPS, ce qui diminue l'affinité des peptides antimicrobiens avec ces derniers. De son côté, l'antigène O permet, notamment, à la bactérie de s'évader du système immunitaire de l'hôte. Il altère l'efficacité de la formation du MAC. Ainsi, les LPS influencent l'accessibilité du complément aux cibles bactériennes, comme par exemple, les porines puisqu'ils distancent le MAC de celles-ci. Par conséquent, les LPS permettent à la bactérie de survivre à son exposition au sérum de l'hôte [104-107].

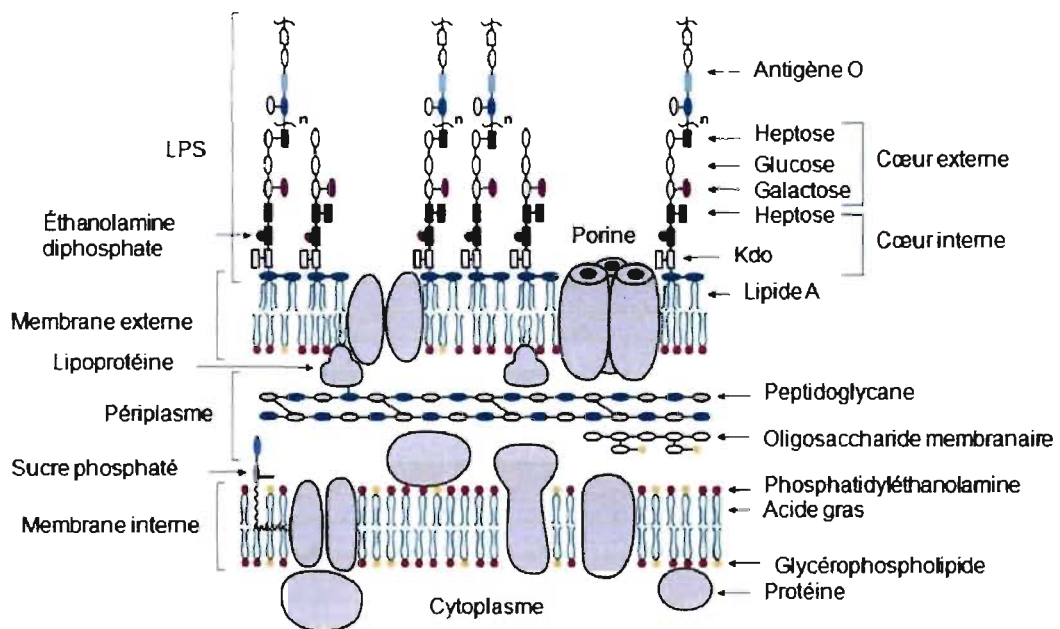


Figure 3. Représentation de l'enveloppe cellulaire de *E. coli* K12 [figure tirée de la réf. [98]]. De l'extrémité distale à l'extrémité proximale, nous retrouvons les LPS (constitué de trois portions: l'antigène O, le cœur oligosaccharidique et le lipide A), la membrane externe (dans laquelle sont incorporées les porines), le peptidoglycane (qui se situe entre la membrane interne et la membrane externe et est relié à cette dernière par les lipoprotéines) et la membrane interne (qui renferme, entre autre, les ABC transporteurs). Les phospholipides sont représentés par les phosphatidyléthanolamines (rouge) et les glycérophospholipides (jaune). Abréviations: Kdo, acide 3-déoxy-d-manno-oct-2-ulosonique; LPS, lipopolysaccharide; heptose, l-glycero-d-manno-heptose.

1.2.3.5 La capsule

Les capsules d'*E. coli* sont des structures enveloppant la surface bactérienne. Elles sont fermement attachées à la surface et sont composées de polysaccharides complexes. De cette manière, la capsule masque, ou couvre, les LPS, ce qui prévient leur agglutination [108]. Elles sont considérées comme un facteur de virulence puisqu'elles protègent la bactérie de la phagocytose, de l'opsonisation et du complément [109, 110]. Les sérotypes capsulaires (80 types différents) sont, plus particulièrement, regroupés en quatre groupes [111]. Les groupes 1 et 4 comportent les capsules liés aux LPS (K_{LPS}) ainsi qu'aux infections intestinales. Celles des groupes 2 et 3 sont liées aux infections extraintestinales [110]. Les capsules de groupe 1 sont composées de polysaccharides acides (par exemple, l'acide uronique) et se ressemblent beaucoup entre elles. Les capsules de groupe 4 se distinguent de celles du groupe 1 par le fait qu'elles sont plus distinctes les unes des autres et sont constituées de sucres acétamides. De plus, ces deux groupes de capsule sont exprimés selon deux formes, capsulaire proprement dite et liée aux LPS (K_{LPS}). Pour leur part, les capsules du groupe 2 et 3 détiennent sensiblement les mêmes caractéristiques générales. Pour chacun des sérotypes, elles possèdent des caractéristiques structurales extrêmement variées. Certaines possèdent des groupements phosphatés et ressemblent à l'acide téichoïque de la paroi des bactéries à coloration de Gram positive [110].

La capsule la plus étudiée est celle de type K1 (capsule de groupe 2). Cette capsule inactive le complément et ce, due à la fixation du régulateur du complément (facteur H) au niveau de la capsule. Cette fixation ralentit donc l'activation du complément et par conséquent, la formation du MAC [112-114]. De plus, les souches possédant une capsule de type K1 sont plus résistantes à la phagocytose et à l'effet bactéricide du sérum [115-118].

Comme nous venons de le constater, les souches aviaires possèdent une multitude de facteurs associés à la virulence. Ces facteurs permettent à la bactérie de s'adapter à chacun des microenvironnements qu'elle rencontre. Cette adaptation permet donc aux bactéries pathogènes d'établir une infection.

2.1 Le régulon Pho

2.1.1 Le phosphate

Le phosphate, en tant que composant cellulaire, est le troisième élément en importance (après le carbone et l'azote). Le phosphate se retrouve dans la composition d'innombrables molécules telles les lipides membranaires (phospholipides), les sucres complexes (les lipopolysaccharides) et les acides nucléiques. Le phosphate est impliqué dans le métabolisme énergétique et peut aussi être incorporé au niveau protéique lors de modifications posttraductionnelles [119]. De plus, le phosphate est impliqué dans plusieurs réactions biochimiques telles la transduction des signaux par les systèmes de régulation à deux composants.

E. coli (comme plusieurs espèces bactériennes) utilise trois sources différentes de phosphate : le phosphate inorganique (P_i), les organophosphates (esters de phosphate) et les phosphonates. Indépendamment de la source de phosphate, l'incorporation du phosphate suit deux étapes communes. La première consiste en son acquisition et la deuxième repose sur son entrée et son assimilation au niveau du cytoplasme [119].

2.1.2 Différentes sources de phosphate

La source la plus importante de phosphate est le P_i , qui lui, se retrouve sous trois formes : le P_i , le pyrophosphate (PP_i) et le métaphosphate ($polyP_i$). Le système impliqué dans l'acquisition du P_i , à partir de l'environnement, est le système Pst (phosphate specific transport system). Ce système est un membre du régulon Pho (qui sera détaillé plus loin dans ce chapitre) et est sous le contrôle du système de régulation à deux composants PhoBR. Le P_i peut être formé à partir des organophosphates et ce, dépendamment s'ils sont transportables ou non. Cependant, la plupart des organophosphates ne le sont pas. De ce fait, ils gagnent l'espace périplasmique (avec l'aide ou non de porines particulières) et sont hydrolysés par une variété d'enzymes, mais plus particulièrement par la

phosphatase alcaline (PhoA), une phosphomonoestérase non-spécifique. PhoA est un membre du régulon Pho et est donc sous le contrôle de PhoBR. L'hydrolyse des organophosphates, par PhoA, libère le P_i , qui lui, est transporté au niveau du cytosol par le système Pst. De plus, quelques organophosphates sont transportables et, parmi ceux-ci, se trouve le *sn*-glycérol-3-phosphate (G3P). Le G3P est transporté directement à l'intérieur de la cellule par le système Ugp. Ce système est aussi sous le contrôle de PhoBR. Finalement, les phosphonates constituent un large groupe de composés organophosphates possédant des ponts carbone-phosphate (C-P), à la place des ponts esters carbone-oxygène-phosphate retrouvés chez les autres familles d'organophosphates. L'utilisation des phosphonates, comme source de phosphate, requiert le clivage du pont C-P. Le transport et le métabolisme des phosphonates s'effectuent par le système Phn qui, lui aussi, est sous le contrôle de PhoBR [119].

2.1.3 Transport du P_i par les systèmes Pit et Pst

E. coli possède deux types de transporteurs du P_i , le système Pit et le système Pst. Le système Pit est un transporteur de faible affinité, de haute vélocité, ayant un K_m de 38,2 μM et un V_{\max} de 55 nmol de P_i par minute et par mg de protéine. D'autre part, le système Pst est un transporteur de haute affinité, de faible vélocité, ayant un K_m de 0,4 μM et un V_{\max} de 15,9 nmol de P_i par minute et par mg de protéine [120, 121]. Lorsque la concentration en phosphate du milieu extracellulaire est supérieure à 4 μM , celui-ci est transporté par le système Pit, qui semble être exprimé constitutivement. Cependant, en condition de carence en P_i , le système Pst voit son expression augmenter plus de 100 fois et le P_i est principalement transporté par ce système. Étant donné que le système Pst est induit en condition de carence en phosphate, contrairement au système Pit, le système Pst fait partie du régulon Pho et est sous le contrôle de PhoBR [119]. Le P_i peut aussi, à moindre échelle, être transporté par les transporteurs GlpT et UhpT (deux systèmes de transport d'organophosphate) [119] et par le système de transport du phosphonate PhnCDE [122].

2.1.3.1 Composants des systèmes Pit et Pst

L'énergie nécessaire au transport du P_i par le système Pit est produite à l'aide de la force Proton-motrice (FPM). Le système Pit est composé de deux transporteurs, PitA et PitB. PitA est constitutivement exprimée tandis que l'expression de PitB s'effectue en condition de forte concentration en phosphate, dû à sa répression par le régulon Pho [121, 123, 124]. Pour sa part, l'opéron *pstSCAB-phoU* code pour le système Pst et fait partie de la grande famille des ABC transporteurs (ATP-binding cassette) [119, 125]. Le système Pst est composé d'une protéine périplasmique de haute affinité pour le P_i (PstS), de deux protéines membranaires formant un canal (PstC et PstA), d'une protéine liant l'ATP (PstB) et de PhoU [124, 126]. Les protéines PstSCAB forment l'ABC transporteur tandis que le rôle de PhoU reste à être élucidé. Cependant, il a été démontré que PhoU n'est pas impliqué dans le transport du P_i , mais plutôt dans la régulation de l'activation du régulon Pho et ce, par l'entremise de PhoBR [127, 128]. De plus, la cristallisation de la protéine PhoU, chez *Thermotoga maritima* et *Aquifex aeolicus*, a montré que PhoU possède une structure STAT (transduction du signal et activateur de la transcription) et des sites de fixation du fer (co-facteur), ce qui renforce l'hypothèse que PhoU est impliqué dans la régulation de l'activation du régulon Pho [127, 129].

La forte spécificité du système Pst pour le P_i est conférée par PstS, qui possède un unique site de fixation pour le P_i (K_d d'environ 1 μ M) [130]. Ce site permet aux anions divalents ($H_2PO_4^-$) et monovalents (HPO_4^{2-}) de se fixer directement sur PstS [119]. Suite à la fixation du phosphate sur PstS, l'hydrolyse de l'ATP par PstB (ce qui permet la libération de l'énergie nécessaire à la translocation du P_i) et par l'intermédiaire des protéines membranaires PstCA qui forment, au niveau de la membrane interne, un canal membranaire, le P_i passe du milieu périplasmique au milieu cytoplasmique.

2.2 Membres du régulon Pho

En condition de carence en phosphate, lorsque la concentration du milieu extracellulaire est inférieure à 4 μ M [119], les cellules bactériennes perçoivent cette

condition et activent la transcription des gènes faisant partie du régulon Pho. Chez *E. coli*, le régulon Pho est composé d'au moins 42 gènes (Tableau I à la page 24) [119, 131-134] codant, notamment, pour des protéines impliquées dans l'acquisition et le métabolisme de diverses sources de phosphates (P_i , organophosphates et phosphonates). Chez *E. coli*, il a aussi été mis en évidence, par une étude protéomique, que la réponse à une carence en phosphate implique plus de 400 protéines [135]. Cependant, ce n'est pas parce qu'une protéine est produite lors d'une carence en phosphate que celle-ci fait partie du régulon Pho. Les membres du régulon Pho se caractérisent par la présence d'une boîte Pho au niveau de leur promoteur [119, 132]. Une boîte Pho est constituée de deux séquences directes répétées de 7 nucléotides (nt) 5'-CTGTCAT-3' séparées par 4 nt [119]. Cette séquence est reconnue par le régulateur PhoB et l'interaction PhoB-boîte Pho active ou réprime la transcription des gènes.

Dans le but de prédire les gènes régulés par PhoB, Yuan *et al.* [136] ont effectué une analyse *in silico* des promoteurs des gènes afin d'identifier ceux possédant des boîtes Pho putatives et ce, chez 13 espèces bactériennes. Ils ont construit une matrice à l'aide de 15 séquences de boîte Pho provenant de *Sinorhizobium meliloti* et *E. coli*. À l'aide de cette matrice, l'algorithme recherche parmi les différents génomes la présence de boîtes Pho au niveau des promoteurs. Un score est alors attribué à chacune des boîtes Pho putative retrouvées dans la région promotrice des gènes. Les résultats sont alors filtrés de manière à ce que les membres potentiels du régulon Pho possèdent au moins une boîte Pho putative entre les nucléotides -500 et +100 du codon départ et un score $\geq 0,35$. De cette manière, chez *S. meliloti*, les auteurs ont identifiés 96 gènes possédant au moins une boîte Pho et de ceux-ci, 34 ont été démontrés comme étant régulés par PhoB [136]. De plus, cette analyse a permis de mettre en évidence que le régulon Pho de la souche *E. coli* K12 MG1655 possède 107 candidats tandis que la souche entérohémorragique O157 :H7 SAKAI compte 103 candidats, dont sept se retrouvent sur des plasmides. Cependant, des preuves expérimentales sont nécessaires afin de valider cette analyse.

2.2.1 Transduction du signal lors d'une carence en phosphate

2.2.2 La protéine senseuse PhoR

Comme mentionné précédemment, en condition de carence en phosphate, la bactérie perçoit cette condition et active la transcription des gènes faisant partie du régulon Pho. Le régulon Pho, pour sa part, est contrôlé par PhoBR, qui est constitué de la protéine senseuse PhoR et de la protéine régulatrice PhoB. PhoR est retrouvée au niveau de la membrane interne. Elle est composée de 431 acides aminés (a.a.) [137] et possède trois domaines. L'extrémité N-terminale est composée de 50 a.a. et forme deux segments transmembranaires en forme d'hélice alpha (α). De plus, un court segment de 5 à 7 a.a. forme une épingle à cheveux de forme hélicoïdale qui se retrouve au niveau périplasmique [138]. Ce domaine contiendrait le site de fixation du P_i . La majeure partie de PhoR se retrouve au niveau cytoplasmique et est constituée de deux domaines, dont un de 150 a.a., qui lie la portion membranaire, et un domaine histidine kinase [139]. Le domaine histidine kinase, quant à lui, est retrouvé au niveau de l'extrémité C-terminale de PhoR. Il est hautement conservé et est commun à la grande famille des protéines senseuses [140]. En condition de carence en phosphate, PhoR s'autophosphoryle au niveau de l'histidine en position 213 [141]. Le groupement phosphoryl est ensuite transféré au niveau de l'acide aspartique 53 du régulateur PhoB [142], ce qui entraîne son activation. De plus, PhoR possède une activité phosphatase, ce qui lui permet d'inactiver PhoB lorsque la concentration du milieu extracellulaire est supérieure à 4 μ M [119].

2.2.3 La protéine régulatrice PhoB

Pour sa part, PhoB fait partie de la famille des régulateurs de type OmpR/PhoB [143]. Cette famille se caractérise par un domaine de fixation à l'ADN en forme d'hélice ailée (winged-helix). C'est une protéine cytoplasmique de 229 a.a. comportant deux domaines [137]. Le domaine N-terminal, composé d'environ 100 a.a., comprend le domaine receveur (reçoit le groupement phosphoryl du senseur PhoR), tandis que le domaine régulateur (domaine de fixation à l'ADN) se retrouve au niveau dans de la portion C-terminale [119]. Ainsi, une carence en phosphate

entraîne l'autophosphorylation du senseur PhoR, qui lui, transfère son groupement phosphoryl au régulateur PhoB et ce, au niveau de l'acide aspartique en position 53 (domaine receveur). Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation, ce qui active le régulateur PhoB. L'activation de PhoB augmente 150 fois l'affinité du domaine régulateur de PhoB pour les boîtes Pho retrouvées au niveau des promoteurs de gènes faisant partie du régulon Pho [144]. De cette manière, PhoB se fixera au niveau des promoteurs des gènes possédant une boîte Pho et interagira avec la sous-unité σ^{70} de l'ARN polymérase [145, 146]. L'interaction entre PhoB et l'ARN polymérase activera ou inhibera la transcription des gènes.

2.2.4 Complexe d'activation du régulon Pho

Le système de régulation à deux composants PhoBR et le système Pst sont moléculairement inter-reliés. Lorsque la concentration du milieu extracellulaire est supérieure à 4 μM , le système Pst forme, avec le senseur PhoR, un complexe répressif, ce qui inhibe son autophosphorylation et par conséquent, l'activation du régulateur PhoB [119, 147, 148]. Cette inhibition requiert un système Pst intact, ainsi que les protéines PhoU et PhoR (sous sa forme réprimée) [149]. D'autre part, une carence en phosphate entraîne la conversion du senseur sous sa forme activée, ce qui entraîne l'activation de PhoB. Cependant, le changement de conformation entraînant l'activation de PhoR n'est pas connu. Une faible occupation du système Pst ou du site de fixation de PhoR entraînerait l'activation de ce dernier et par conséquent, de PhoB. De l'autre côté, une complète occupation du système Pst, du site de fixation de PhoR ou son association au complexe répressif entraînerait son inactivation et par conséquent, l'inactivation de PhoB [119] (Fig. 4).

2.3 Phénotypes associés à l'activité du régulon Pho

Comme mentionné précédemment, le régulon Pho, chez *E. coli*, est constitué d'au moins 42 gènes. Ainsi, les gènes faisant partie de ce régulon sont transcrits lorsque la concentration du milieu extracellulaire est inférieure à 4 μM . De cette manière, les gènes retrouvés dans ce régulon codent en majorité pour des protéines impliquées dans l'acquisition et le métabolisme de différentes sources de phosphate (P_i ,

phosphonate et organophosphate) [119]. Récemment, il a été mis en évidence que certains gènes, qui ne sont pas impliqués dans l'acquisition et le métabolisme du phosphate, sont transcrits en condition de carence en phosphate et ce, d'une manière PhoB-dépendante (Tableau I) [131, 134, 150]. Ces données montrent qu'une carence en phosphate a un effet pléiotropique au niveau de la cellule et n'est donc pas uniquement impliquée dans l'utilisation du phosphate. À la vue de l'effet pléiotropique de la réponse à une limitation de phosphate, plusieurs phénotypes ont été associés à l'état d'activation du régulon Pho. De cette manière, certains de ces phénotypes seront décrits au cours des prochaines sections (Tableau II en page 26).

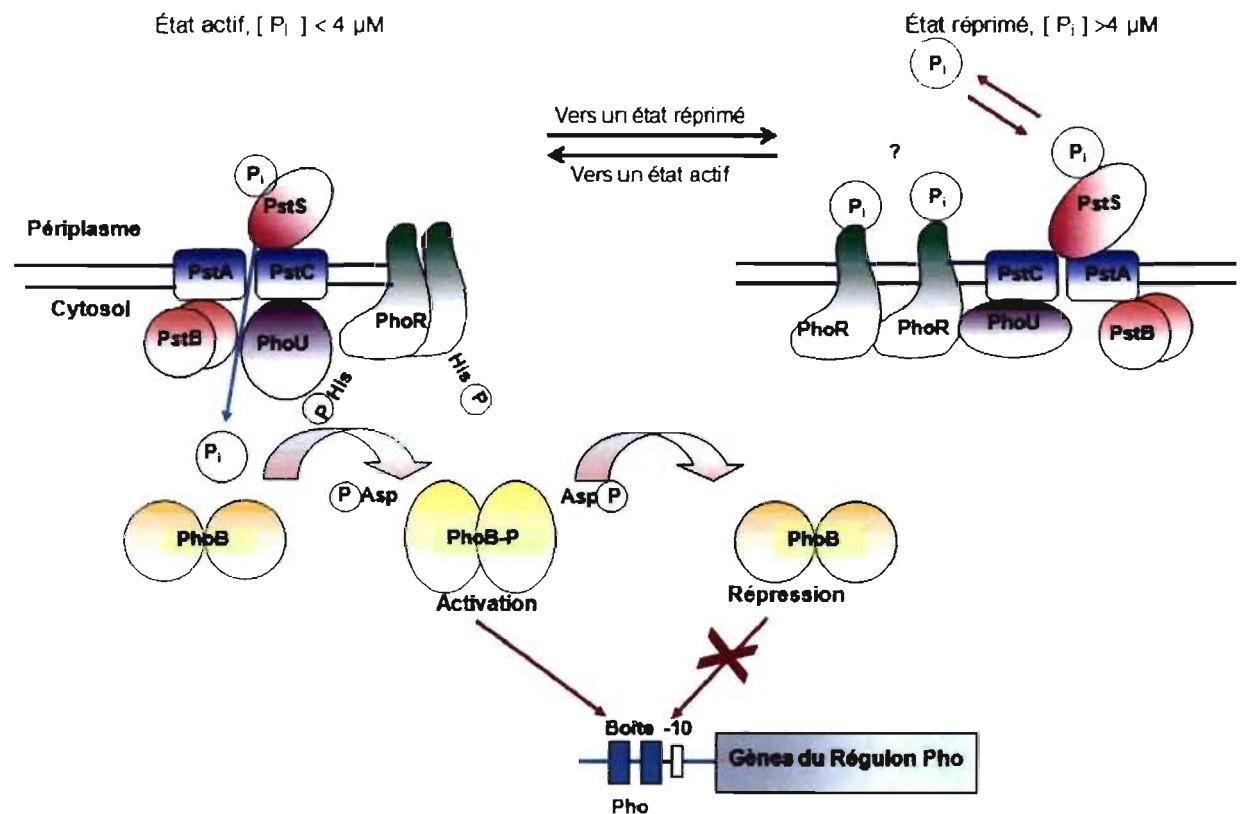


Figure 4. Contrôle transcriptionnel du régulon Pho et transduction transmembranaire du signal par le phosphate inorganique (P_i) environnemental, adapté de Lamarche *et al.* [147]. Abréviations: P_i , phosphate inorganique; PstS, protéine périplasmique de haute affinité fixant le P_i ; PstA et PstC, Protéine formant un canal membranaire; PstB, protéine de liaison à l'ATP; PhoU, protéine régulatrice; PhoR, senseur; PhoB, régulateur. Pour les détails concernant la transduction du signal ainsi que l'activation de la transcription des gènes du régulon Pho, se référer au texte.

Tableau I. Gènes composant le régulon Pho

Gène ou opéron	Nombre de boîtes Pho ^a	Fonction	Gène	Description	Références
<i>amn</i>	2		<i>amn</i>	AMP nucléosidase	[131, 136]
<i>asr</i>	2		<i>asr</i>	Résistance à l'acidité	[134]
<i>iciA</i>	2		<i>iciA</i>	Initiateur de la réplication du chromosome	[136, 150]
<i>phnCDEFGHIJ KLMNOP</i>	2	Transport et métabolisme des phosphonates	<i>phnC</i>	Protéine de liaison à l'ATP impliquée dans le transport des phosphonates	[119, 136]
			<i>phnD</i>	Protéine périplasmique fixatrice	
			<i>phnE</i>	Protéine formant un canal membranaire	
			<i>phnF</i>	Régulateur	
			<i>phnGHIJKLM</i>	Composants de la lyase carbone-phosphate	
			<i>phnNP</i>	Protéines accessoires de la lyase carbone-phosphate	
			<i>phnO</i>	Régulateur	
<i>phoA-psiF</i>	2	Hydrolyse des esters de phosphate	<i>phoA</i>	Phosphatase alcaline	[119, 136]
		Inconnu	<i>psiF</i>		
<i>phoBR</i>	1	Contrôle du régulon Pho	<i>phoB</i>	Régulateur	[119, 136]
			<i>phoR</i>	Senseur	
<i>phoE</i>	1	Entrée de polyanions	<i>phoE</i>	Porine	[119, 136]
<i>phoH</i>	3	Inconnu	<i>phoH</i>	Protéine de liaison à l'ATP	[119, 136]

<i>psiE</i>	1	Inconnu	<i>psiE</i>	Protéine hydrophobe	[119, 136]
<i>pstSCAB-phoU</i>	9	Transport du P _i et contrôle du régulon Pho	<i>pstS</i>	Protéine périplasmique fixatrice du P _i de haute affinité	[119, 136]
			<i>pstCA</i>	Protéines formant un canal membranaire	
		Contrôle du régulon Pho	<i>pstB</i>	Protéine de liaison à l'ATP	
<i>ugpBAECQ</i>	9	Transport du glycérol-3-phosphate	<i>phoU</i>	Régulateur	
			<i>ugpB</i>	Protéine périplasmique fixatrice	[119, 136]
			<i>ugpAE</i>	Protéines formant un canal membranaire	
			<i>ugpC</i>	Protéine de liaison à l'ATP	
			<i>ugpQ</i>	Phosphodiesterase	
<i>yibD</i>	1		<i>yibD</i>	Glycosyl transférase putative	[131]
<i>ytfK</i>	1		<i>ytfK</i>	Protéine hypothétique	[131]

^a Le nombre de boîtes Pho identifié se base sur l'étude de Yuan *et al.* [136]

Tableau II. Phénotypes retrouvés lorsque le régulon Pho est actif

Espèces bactériennes	Phénotypes	Références
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	^a ↑ formation de biofilm	[151]
	^a ↑ activité de catalase	[152]
<i>Bacillus subtilis</i>	^a Modification de la paroi cellulaire (Remplacement de l'acide téichoïque par l'acide téichuronique)	[153-156]
	^a ↑ autolyse cellulaire	[157]
<i>Caulobacter crescentus</i>	^a Formation d'une tige (« stalk »)	[158, 159]
<i>Escherichia coli</i>	^a Établissement de la réponse stringente	[160-162]
	^b ↓ résistance au sérum, ↓ virulence	[163, 164]
	^b ↓ résistance à l'acidité,	[164]
	^b ↓ résistance polymyxine B	
	^b ↓ lésions attachantes-effaçantes	[165]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	^a ↑ activité de catalase	[152]
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	^{a, b} ↓ formation de biofilm	[166]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	^{a, b} ↓ formation de biofilm	[167]
<i>Shigella flexneri</i>	^b ↓ formation de plages de lyse	[168]
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	^a ↑ activité catalase	[152]
	^a Paroi avec peu ou pas de phosphate	[169]
<i>Vibrio cholerae</i>	^c ↓ de la colonisation intestinale	[170]

Différents phénotypes observés lorsque le régulon Pho est activé. ^a Activation du régulon Pho causée par une carence en P_i du milieu extracellulaire. ^b Activation constitutive du régulon Pho causée par une mutation du système Pst. ^c Répression du régulon Pho par une mutation du régulateur PhoB. Abréviations : ↑, augmentation; ↓, diminution.

2.3.1 Régulon Pho, réponse générale au stress et réponse stringente

2.3.1.2 La réponse générale au stress

Le facteur sigma σ^s , ou RpoS, est un régulateur global impliqué dans l'établissement de la phase stationnaire de croissance ainsi que dans la réponse générale au stress. RpoS est induit par différentes conditions, comme par exemple, une forte osmolarité, le stress oxydatif, l'acidité, la réponse stringente et une carence en nutriments, dont le phosphate [171-173]. De cette manière, RpoS est impliqué dans la régulation d'environ 100 gènes. Étant donné son rôle primordial dans la survie bactérienne, RpoS est finement contrôlé au niveau transcriptionnel, traductionnel ainsi qu'au niveau de sa stabilité protéique [171, 172]. Cependant, le mécanisme clé contrôlant la quantité de RpoS est sa régulation protéolytique [174].

Lorsque les bactéries se retrouvent en phase exponentielle de croissance et ne sont pas confrontées à divers stress, l'adaptateur RssB se fixe au niveau de RpoS, ce qui forme le complexe RssB-RpoS. Ce complexe est alors transporté au niveau du protéasome ClpXP. Par conséquent, RpoS est constamment dégradé. Cependant, lorsque la bactérie est confrontée à un stress, ou se retrouve en phase stationnaire de croissance, la dégradation de RpoS est inhibée, ce qui entraîne son accumulation et, de ce fait, l'activation de la transcription des gènes composant le régulon RpoS. En condition de carence en phosphate, la réponse RpoS s'établit et ce, par l'entremise de la protéine anti-adaptatrice IraP. Lorsque la concentration en P_i du milieu extracellulaire est inférieure à 4 μM , la transcription du gène *iraP* est activée. Donc, lorsqu'IraP est produit, il s'ensuit l'inhibition de la dégradation de RpoS par le complexe protéolytique ClpXP. Cette inhibition s'effectue par la formation d'un complexe IraP-RssB, ce qui inhibe la fixation de RssB à RpoS et donc, empêche sa dégradation (Fig. 5 à la page 29) [175].

En plus de l'effet d'IraP dans l'inhibition de la dégradation de RpoS par le protéasome ClpXP, il a été suggéré qu'en condition de carence en phosphate, l'accumulation de RpoS serait attribuable à un petit ARN régulateur (sRNA) se retrouvant au niveau de la région intergénique entre les gènes *pstA* et *pstB* de l'opéron *pst* [176]. De plus, l'accumulation de RpoS, lors d'une carence en

phosphate, est dépendante de Hfq [177], un régulateur post-transcriptionnel qui interagit avec une variété de sRNA. L'interaction entre Hfq et les sRNA stimule l'appariement des sRNA avec leur ARNm cible, ce qui inhibe ou stimule leur traduction [178, 179]. Ainsi, l'accumulation de RpoS chez un mutant *pstS* suggère qu'une carence en phosphate active la production d'un sRNA, qui lui, est impliqué dans l'accumulation de RpoS [177]. Récemment, Schurdell *et al.* [176] ont démontré que l'extrémité 3' du transcrite traitée des gènes *pstCA* permet l'accumulation de RpoS par l'interaction de ce transcrite avec la région 5' non-traduite de l'ARNm de RpoS. Cette interaction semble stimuler la traduction de l'ARNm, augmentant sa production et par conséquent, son accumulation [176].

2.3.1.3 Réponse stringente

En condition de stress nutritionnels, la production de l'alarmone guanosine tétraphosphate (ppGpp) est activée. Cette molécule contient du phosphate et est impliquée dans le changement du métabolisme bactérien. Ce phénomène se nomme réponse stringente [180-182]. La production du ppGpp s'effectue par les protéines RelA et SpoT, où RelA possède une activité de ppGpp synthétase tandis que SpoT a deux activités, une ppGppase ainsi qu'une ppGpp synthétase. Cependant, en condition de carence en phosphate, l'accumulation de ppGpp s'effectue d'une manière SpoT dépendante, ce qui active la réponse stringente et par conséquent, entraîne la modification du métabolisme [160-162]. Comme mentionné précédemment, l'établissement de la réponse stringente mène à l'accumulation de RpoS, ce qui entraîne l'instauration de la réponse générale au stress. Cependant, le mécanisme moléculaire reliant la carence en phosphate, la réponse stringente et la réponse générale au stress n'était pas connu jusqu'à tout récemment. Il a été montré, par Bougdour et Gottesman [160], que le régulateur reliant les trois conditions mentionnées ci-haut, i.e. une carence en phosphate, la réponse stringente et la réponse générale au stress, est la protéine anti-adaptatrice IraP. De cette manière, le stress provoqué par une carence en P_i entraîne la production de ppGpp et ce, d'une manière SpoT-dépendante. Par la suite, le ppGpp se fixera au niveau du promoteur d'*iraP*, ce qui activera sa transcription. La production d'IraP empêchera donc la dégradation de RpoS par le complexe protéolytique ClpXP (Fig. 5).

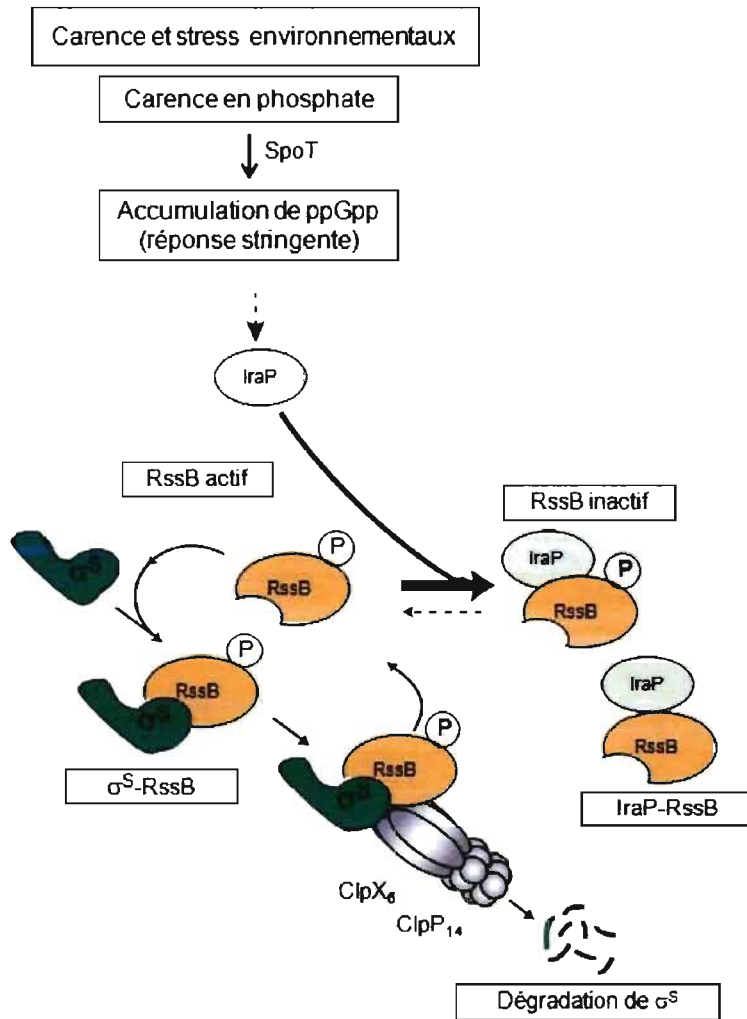


Figure 5. Relation entre la réponse stringente, la réponse générale au stress et le régulon Pho (figure adaptée des réfs. [160, 175]). En phase exponentielle de croissance, l'adaptateur RssB se fixe au niveau de RpoS et le complexe formé est transporté au niveau du protéasome ClpXP, ce qui entraîne une dégradation continue de RpoS. Cependant, lors d'une carence en phosphate, le ppGpp s'accumule d'une manière SpoT dépendante. Cette accumulation de ppGpp, en condition de carence en phosphate, mène à l'activation de la transcription de l'anti-adaptateur *iraP*. L'anti-adaptateur IraP se lie au niveau de RssB, ce qui inhibe son interaction avec RpoS et donc, la dégradation de RpoS par le protéasome ClpXP. Ce mécanisme mène donc à l'accumulation de RpoS et à l'établissement de la réponse générale au stress. Le cercle comportant un P en son centre indique que la protéine est active. Pour plus de détails, se référer au texte.

2.3.2 Modification des composants membranaires

Chez *B. subtilis* et *S. meliloti*, une carence en phosphate entraîne un changement de la composition de leur surface bactérienne. Lorsque *B. subtilis* est confrontée à une carence en phosphate, elle remplace, au niveau de sa paroi membranaire, l'acide téichoïque (riche en phosphate) par l'acide téichuronique (sans phosphate). Donc, à de faibles concentrations de phosphate, les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide téichoïque (les opérons *tagAB* et *tagDEF*) et ceux impliqués dans la biosynthèse de l'acide téichuronique (l'opéron *tuaBCDEFGH*) sont réprimés et induits, respectivement [153-156]. Ces états de répression et d'expression s'effectuent d'une manière PhoP-dépendante (orthologue de PhoB). Pour sa part, *S.*

melliloti remplace ses phospholipides membranaires par des lipides libre de phosphate [183].

Une carence en phosphate, chez *Caulobacter crescentus*, entraîne la formation d'une tige au niveau de sa membrane [158, 159]. Cette tige permettrait l'acquisition de nutriments lorsque ceux-ci sont en très faibles concentrations. Elle minimiserait le coût énergétique associé à l'augmentation des surfaces et volumes.

Les modifications des composants membranaires observées sont dépendantes du régulateur PhoB et répondent donc à une carence en phosphate. Ainsi, cela permet à la bactérie d'optimiser la disponibilité et l'acquisition du phosphate, en plus de maintenir actives ses réactions biochimiques essentielles.

2.3.3 Formation des biofilms

Dans l'environnement, la plupart des microorganismes optent pour un mode de vie de type sessile et vivent dans des structures complexes nommées biofilms. Les biofilms se caractérisent comme étant des communautés bactériennes recouvertes d'une matrice d'exopolysaccharides. Les biofilms forment, entre autre, une barrière physique et permettent à la communauté bactérienne de résister, notamment, aux agents antimicrobiens, détergents et antibiotiques, ce qui lui permet de résister aux agressions [184].

Des études ont démontré qu'il existe une interrelation entre l'activation du régulon Pho et la formation des biofilms. De cette manière, une mutation du système Pst, chez *Pseudomonas aureofaciens* et *P. fluorescens*, abolit la formation des biofilms [166, 167]. Récemment, il a été montré, chez *P. fluorescens*, que cette abolition était due à l'activité de la c-di-GMP phosphodiesterase RapA. L'activation du régulon Pho entraîne donc celle de RapA, ce qui provoque la dégradation du c-di-GMP (molécule régulatrice impliquée, notamment, dans l'activation de la formation des biofilms [185-187]). Cette dégradation du c-di-GMP mène à une diminution de la sécrétion de l'adhésine LapA, adhésine requise pour la formation des biofilms chez *P. fluorescens*. Donc, chez cette bactérie, l'activation du régulon Pho entraîne une diminution de la concentration intracellulaire du c-di-GMP, ce qui compromet la

sécrétion de LapA et par conséquent, l'abolition de la formation des biofilms par cette bactérie [167]. En contrepartie, la formation des biofilms est activée lorsque *A. tumefaciens* est confrontée à un environnement carencé en phosphate [151]. Cependant, les mécanismes moléculaires reliant l'activation du régulon Pho et la formation des biofilms par *A. tumefaciens* ne sont pas connus.

2.3.4 Résistance au stress oxydatif

Le stress oxydatif est produit, notamment, par le métabolisme bactérien (respiration), la réponse du système immunitaire et l'exposition à des facteurs environnementaux de l'hôte, tel les ions métalliques. De plus, le stress oxydatif induit, chez les cellules, des dommages au niveau de l'ADN, des protéines, des membranes et peut donc, mener à la mort cellulaire [188]. De cette manière, il est considéré que la résistance au stress oxydatif est associée à la virulence.

Le stress oxydatif est causé par différents intermédiaires. Ceux-ci concernent, pour les espèces réactives oxygénées (ROS), les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (HO^{\cdot}). Un stress oxydatif peut aussi être causé par les espèces réactives nitrogénées (RNS) et touchent l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}) et le peroxyde nitrite ($ONOO^{\cdot}$). Deux types de réponses existent afin de résister à ce stress. La première concerne la réponse à l' H_2O_2 et ce, par le régulateur OxyR et le sRNA OxyS. La deuxième dépend des régulateurs SoxSR et répond aux anions superoxydes [189].

Yuan *et al.* [152] ont montré qu'une carence en phosphate, chez *S. meliloti*, *P. aeruginosa* et *A. tumefaciens*, entraîne l'induction de la catalase KatA (HP11). En plus de son induction par OxyR [190, 191], KatA est aussi induit par PhoB lorsque la bactérie se retrouve dans un milieu carencé en phosphate. Cette induction, chez *S. meliloti*, entraîne une augmentation de la résistance à l' H_2O_2 lorsque la bactérie est confrontée à une carence en phosphate [152].

De cette manière, il semble que le régulon Pho soit directement impliqué dans la résistance au stress oxydatif. Par contre, une analyse des bases de données montre que cette catalase est absente chez *E. coli*. D'un autre côté, chez *E. coli*, il a été

montré qu'une carence en phosphate entraîne la production d'un stress oxydatif intracellulaire et ce, en raison du métabolisme aérobie du glucose [192]. La résistance des souches requiert la présence des alkylhydroperoxyde réductases AhpCF et la catalase KatG [192, 193]. Cependant, la manière dont réagit *E. coli* à un stress oxydatif externe lorsque confrontée à une carence en P_i n'est pas connue.

2.3.5 Le système Pst et la virulence

Plusieurs méthodes de criblage de gènes induits *in vivo* ont démontré que les gènes associés au régulon Pho sont requis dans l'établissement de l'infection. Ces méthodes passent par la technologie des biopuces à ADN, DFI, l'IVET, le SCOTS et le STM (pour un résumé, voir tableau III en page 34).

Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré qu'une mutation dans le système Pst altère la virulence de souches ExPEC d'origine porcine et aviaire [163, 164]. Ainsi, l'activation constitutive du régulon Pho est néfaste pour ces souches. Ces mutations altèrent plusieurs attributs de virulence, dont la résistance à l'effet bactéricide du sérum [163, 164], la présence de la capsule [163, 194, 195], la résistance aux peptides antimicrobiens [164, 196] ainsi qu'à l'acidité [164]. Ces résultats tendent à démontrer que l'activation constitutive du régulon Pho, provoquée par la délétion du système Pst, entraîne une perturbation membranaire et expliquerait, en partie, l'atténuation de la virulence chez ces souches. Cette hypothèse fut récemment validée par Lamarche *et al.* [196, 197]. Les travaux réalisés ont montré que les mutants Pst étaient plus sensibles à la cécropine et à la vancomycine. De plus, ces mutations influencent la biosynthèse de la forme hexa-acyle 1-pyrophosphate du lipide A, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire ainsi qu'un débalancement de la composition des acides gras membranaires. Ainsi, l'atténuation de la virulence chez les mutants Pst serait due à une perturbation de la membrane. D'autre part, chez une souche EPEC (Entero-Pathogenic E. coli), bactérie causant des infections intestinales, la mutation du gène *pstS* entraîne une diminution de la formation des lésions de type attachant-effaçant et par conséquent, diminuerait la virulence de cette souche [165].

D'autres groupes ont aussi démontré qu'une mutation dans le système Pst provoque une altération de la virulence et ce, chez diverses espèces bactériennes. Par exemple, la délétion du gène *phoU*, chez une souche UPEC, diminue sa capacité à coloniser le tractus urinaire de souris [198]. De plus, une diminution de la colonisation du tractus urinaire de souris, chez des mutant *pstS* et *pstC*, est aussi retrouvée chez *Proteus mirabilis* [199, 200]. Chez *Edwardsiella tarda*, bactérie impliquée dans des infections extraintestinales chez les poissons et les mammifères, une mutation des gènes *pstS*, *pstC* et *pstB* diminue la production de protéines impliquées dans la formation du translocon du système de sécrétion de type III, atténue sa capacité à se multiplier à l'intérieur des phagocytes, à résister à l'effet bactéricide du sérum et donc, diminue sa virulence [201]. Finalement, chez *Shigella flexneri*, la mutation de *pstS* diminue la capacité de la souche mutante à former des plages de lyses au niveau des cellules intestinales [168]. En résumé, ces résultats montrent que le système Pst, en plus de son rôle dans le transport du P_i , est impliqué dans la régulation de la pathogenèse bactérienne.

2.3.6 PhoBR et la virulence

Étant donné qu'une mutation dans le système Pst entraîne l'activation constitutive du régulon Pho, son action sur la virulence passerait donc par PhoBR. L'utilisation de la technologie SCOTS (selective capture of transcribed sequences) a montré que, chez la souche APEC χ 7122, le gène *phoB* est transcrit *in vivo* chez un modèle expérimental de poulet [75]. De plus, la délétion de l'opéron *phoBR* devrait diminuer la virulence des souches pathogènes. De cette manière, chez *A. tumefaciens*, le gène *chvI*, un homologue de *phoB*, est essentiel à l'établissement de l'infection [221]. Chez *Corynebacterium glutamicum*, des expériences de biopuces à ADN, qui comparaient la réponse transcriptionnelle d'une souche sauvage et son mutant isogénique *phoB* cultivés en milieu carencé en phosphate, ont démontré que l'activation du régulon Pho entraîne la modulation de la transcription des gènes reliés à la virulence, dont les systèmes d'acquisition du fer [222]. Lorsque cultivée en condition de carence en phosphate, une souche sauvage de *Vibrio cholerae*, comparativement à son mutant isogénique *phoB*, démontre une surexpression des gènes associés à la virulence, comme par exemple, l'hémolysine [170, 223]. De plus, la délétion du gène *phoB* diminue sa capacité à coloniser l'iléum de lapin [170].

Tableau III. Identification des gènes exprimés *in vivo* dépendant de PhoB à l'aide de modèles d'infections

Espèces	Modèle d'infection ^a	Sélection ^b	Références
<i>Brucella melitensis</i>	Septicémie murine (BALB/c)	STM	[202]
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Infection pulmonaire chronique chez le rat (Sprague-Dawley)	STM	[203]
<i>Campylobacter jejuni</i>	Infection intestinale aviaire (SPF Light Sussex)	STM	[204]
	Infection de cellules intestinales humaines (INT407)	Biopuce ADN	[205]
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Macrophages murins (J774A.1)	DFI	[206]
<i>Escherichia coli</i>	Infection du tractus urinaire murin (CBA)	STM	[198]
	Septicémie murine (ICR)	IVET	[64]
	Infection extraintestinale aviaire (Leghorn SPF)	SCOTS	[75]
<i>Erwinia amylovora</i>	Maladie nécrotique de plante (Poire immature, <i>Pyrus communis</i> L. cv. 'Bartlett')	IVET	[207]
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Maladie de plante (Feuille d'épinard)	IVET	[208]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Septicémie murine (ICR Swiss)	IVET	[209]
	Macrophages murins (P388D1)	Biopuce ADN	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Intranasal murin (C57Bl/6j)	STM	[210]

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Poumon murin (BALB/c and BALB/c ^{SCID/SCID})	Biopuce ADN	[211]
<i>Proteus mirabilis</i>	Infection du tractus intestinal murin (CBA)	STM	[199]
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Macrophages murins (RAW 264.7)	DFI	[212]
<i>Salmonella Typhi</i>	Monocytes humains (THP-1)	SCOTS	[213]
<i>Shigella flexneri</i>	Cellules intestinales humaines (INT407)	DFI	[214]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Septicémie et pneumonie murine (BALB/c)	STM	[215]
	Bactériémie et transport nasopharyngiale murine (Swiss Webster)	STM	[216]
	Infection du tractus respiratoire murin (CD-1)	DFI	[217]
	Inflammation de l'oreille moyenne murine (Gerbille mongolienne)		
<i>Vibrio cholerae</i>	Chambre intrapéritonéale murine (CD-1)		
	Allaitement murin (CD-1)	STM	[218]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Septicémie et infection intestinale murin (BALB/c)	STM	[219]
<i>Yersinia pestis</i>	Infection du tractus respiratoire murin (C57BL/6)	Biopuce ADN	[220]

1 ^a Entre parenthèses, les souches animales ou lignées cellulaires utilisées dans les études. ^b STM, signature-tagged mutagenesis. DFI, differential fluorescence
2 induction. IVET, *in vivo* expression technology. SCOTS, selective capture of transcribed sequences. (Adapté de réf. [184]).

Ces résultats montrent que le système de régulation à deux composants PhoBR, en plus de son rôle dans la régulation de l'homéostasie du phosphate, joue un rôle dans la régulation de la pathogenèse bactérienne. Cependant, les mécanismes moléculaires reliant le régulon Pho et la virulence ne sont pas connus.

2.4 Études transcriptomiques et protéomiques du régulon Pho

Étant donné que l'activation du régulon Pho entraîne une réponse pléiotropique, plusieurs équipes ont entrepris des études transcriptomiques et protéomiques afin de déterminer la réponse bactérienne globale causée par un état d'activation du régulon Pho et ce, chez diverses espèces bactériennes (Tableau IV en page 38).

2.4.1 La transcriptomique

La transcriptomique sert à l'étude globale de la transcription des gènes. De cette manière, elle permet la mesure individuelle et quantitative, à un moment précis, des ARN messagers ainsi que des ARN non-codant présents dans la cellule.

De manière générale, la transcriptomique consiste à extraire les ARN des souches que l'on désire étudier. À partir des ARN extraits, de l'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé et ce, à l'aide d'amorces aléatoires. Suite à cette synthèse, les ARN sont dégradés et les ADNc sont purifiés et marqués à l'aide de fluorochrome ou de la biotine. Les ADNc marqués sont ensuite fragmentés et hybridés sur une biopuce contenant le génome complet de la souche étudiée. Le génome est, quant à lui, représenté par de petits fragments d'ADN (nommé sonde) de 25 à 75 nucléotides localisés à des endroits spécifiques sur la biopuce. Les sondes sont donc complémentaires aux ADNc et cette complémentarité permet aux ADNc de se fixer au niveau de sa sonde. Afin d'éviter l'apparition de faux-positifs, les ADNc qui ne se seront pas hybridés sont éliminés par lavage. Finalement, les sondes hybridées avec leur ADNc seront révélées et ce, à l'aide de la fluorescence ou la streptavidine. Suite à la révélation, les biopuces sont numérisées et analysées (Fig. 6 en page 41).

L'analyse des résultats consiste à déterminer l'intensité des spots (sondes hybridées avec leurs ADNc), la normalisation, la comparaison entre groupes de puces,

l'identification des gènes différentiellement exprimés et la classification de ceux-ci en groupement fonctionnel. L'intensité des spots correspond au niveau d'expression des gènes. Donc, plus un spot est intense, plus le gène est exprimé et vice-versa. Pour sa part, la normalisation sert à identifier et à réduire les effets des variations systématiques autres que les variations dues au traitement. La comparaison entre groupes de puces permet, par exemple, de dresser la liste des gènes différentiellement exprimés entre deux souches et ce, dans une condition expérimentale donnée. De son côté, l'identification des gènes différentiellement exprimés s'effectue à l'aide de la localisation des spots sur la biopuce. Finalement, afin d'obtenir une globalité des gènes différentiellement exprimés, ceux-ci peuvent être classés en groupement fonctionnel, comme par exemple, les gènes impliqués dans les processus cellulaires, la synthèse protéique, le transport, etc.

La validation des résultats de biopuces à ADN est une étape essentielle dans les analyses transcriptomiques. Cette validation peut être effectuée à l'aide de la « Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction » (qRT-PCR). La qRT-PCR consiste à une transcription inverse des ARNm suivie d'une réaction PCR standard, à l'exception que le transcrit est quantifié. La quantification s'effectue à l'aide de marqueurs fluorescents, par exemple, le SYBR green. Ainsi, lors des étapes de PCR, le SYBR green s'incorpore au niveau des deux brins d'ADN et émet de la fluorescence. La fluorescence n'est émise que lorsque le SYBR green est incorporé au niveau de l'ADN double brin. Le taux d'émission de fluorescence est alors mesuré pour chacun des cycles de PCR. Ainsi, plus il y a d'ARNm, plus il y aura formation d'ADN et plus la fluorescence sera intense et apparaîtra tôt lors des cycles de PCR [231].

Les résultats peuvent être analysés selon deux méthodes, absolue ou relative. En ce qui concerne la quantification absolue, la quantité d'acide nucléique mise au départ doit être connue et l'établissement d'une courbe étalon est nécessaire à la quantification du transcrit. Pour sa part, la méthode relative implique l'amplification d'un gène de référence, dont l'expression doit être constante entre les souches testées, contre lequel les valeurs des gènes testés seront normalisées. Les ratios seront alors comparés entre les différentes souches testées et un taux d'expression sera calculé [232, 233].

Tableau IV. Étude de la réponse globale à un milieu carencé en phosphate à l'aide de la technologie transcriptomique et protéomique

Espèces bactériennes	Technologie utilisée	Nombre de gènes ou protéines différenciellement exprimées	Systèmes affectés par l'activation du régulon Pho ^a	Nouveaux membres du régulon Pho ^b	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	- Protéomique	- 45 protéines induites	Induction de : - Réponse générale au stress (σ^B) - Stress oxydatif	- <i>glpQ</i> - <i>ydhF</i>	[224]
	- Transcriptomique	- 24 gènes induits	Induction de : - Réponse générale au stress (σ^B) - Fonction inconnue	- <i>yfKN</i> - <i>yjdB</i> - <i>yurl</i> - <i>vpr</i>	[225]
		- 69 gènes réprimés	Répression de : - Synthèse protéique - Synthèse acides nucléiques		
<i>Bacillus licheniformis</i>	- Transcriptomique	- 98 gènes induits	Induction de : - Fonction inconnue - Transport - Sporulation - Métabolisme énergétique	- 29 gènes	[226]
		- 94 gènes réprimés	Répression de : - Fonction inconnue - Métabolisme des coenzymes et des acides nucléiques - Synthèse protéique - Chémotaxie et mobilité		
	- Protéomique	- 48 protéines induites	- Même tendance que l'étude transcriptomique		

<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	- Protéomique	- 208 protéines induites - 205 protéines réprimées	- Beaucoup de protéines non identifiés ^c	[135]
	- Transcriptomique	- 33 gènes induits	Induction de : - Fimbriae F9 - Résistance à l'acidité - Fonction inconnue	- <i>amn</i> - <i>yibD</i> - <i>ytfK</i> [131]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	- Transcriptomique	- 92 gènes différentiellement exprimés ^d	Induction de : - Métabolisme du cuivre - Dégradation des sidérophores	[227]
			Répression de : - Synthèse protéique - Acquisition du fer	
<i>Streptomyces coelicolor</i>	- Transcriptomique	- 529 gènes différentiellement exprimés ^e	Induction de : - Biosynthèse de la paroi - Respiration cellulaire (nitrate)	- <i>sco4879</i> - <i>sco0034</i> - <i>sco2878</i> - <i>sco4261</i> - <i>sco4262</i> [228]
			Répression de : - Synthèse des acides aminés - Synthèse protéique	
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	- Transcriptomique	- 138 gènes induits	Induction de : - Transport du fer - Résistance au stress oxydatif - Biosynthèse d'exopolysaccharides	- 11 gènes ^f [229]
		- 86 gènes réprimés	Répression de : - Métabolisme des acides aminés - Synthèse et repliement protéique - Chémotaxie et mobilité	

<i>Vibrio cholerae</i>	- Protéomique	- 67 protéines induites	Induction de :	- 9 gènes	[223]
			- Transporteurs, - Protéines hypothétiques, - Facteurs transcriptionnels - Biosynthèse des acides aminés		
		- 73 protéines réprimées	Répression de :		
			- Protéines hypothétiques - Transporteurs - Biosynthèse, stabilisation et repliement protéique - Biosynthèse de l'enveloppe cellulaire		

^a Dans chacune des ces études, le régulon Pho était induit, donc nous n'en ferons pas mention dans ce tableau. ^b Les gènes en gras ont été expérimentalement validés. Les gènes qui ne sont pas en gras sont prédits comme étant membre du régulon Pho puisqu'ils possèdent, au niveau de leur promoteur, des boîtes Pho putatives. ^c Le premier génome de *E. coli* K12 fut publié en 1997 [230], ce qui explique que la majorité des protéines n'ont pu être identifiées. ^d Une évolution de la réponse à une carence en phosphate a été entreprise au cours de cette étude. Ce qui signifie qu'à un temps, un gène peut être surexprimé tandis qu'à un autre temps, il est réprimé. ^e Dans cette étude, 12 profils transcriptionnels différents ont été observés. ^f Les régions promotrices des gènes différentiellement exprimés ont été analysées afin d'y trouver des boîtes Pho putatives. Les gènes identifiés furent expérimentalement validés par Yuan *et al.* [136].

2.4.2 La protéomique

L'étude globale protéomique repose sur l'extraction des fractions protéiques (cytoplasmique, périplasmique, membranaire, extracellulaire) et leur migration sur gel bidimensionnel. La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur charge (focalisation isoélectrique). Suite à cette première séparation, les protéines seront différenciées selon leur poids moléculaire, qui consiste en la méthode classique d'électrophorèse sur gel polyacrylamide.

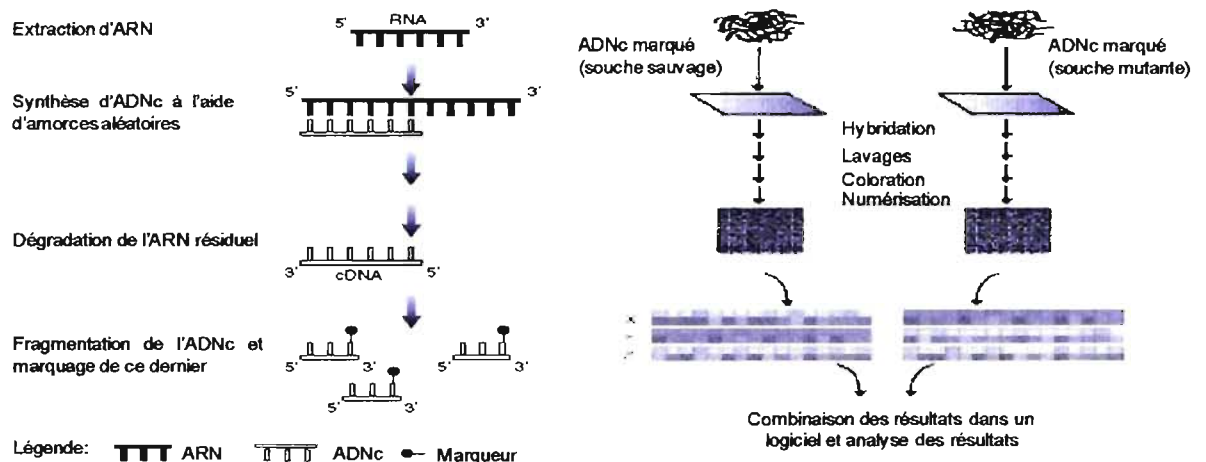


Figure 6. Schématisation de l'approche expérimentale employée dans l'utilisation de la technologie des biopuces à ADN (adapté du manuel Prokaryotic Sample and Array Processing d'Affymetrix. https://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_s3_manual.pdf). Suite à l'extraction des ARNs, de l'ADNc est synthétisé à l'aide d'amorces aléatoires de 6 nt. Suite à la synthèse de l'ADNc, l'ARN résiduel est éliminé afin qu'il n'interfère pas avec l'hybridation de l'ADNc sur la biopuce. Par la suite, l'ADNc est fragmenté puis marqué, ce qui permettra de déterminer le niveau d'expression ainsi que l'identification du gène. Une fois les ADNc marqués, ceux-ci sont hybridés au niveau des biopuces, qui contiennent le génome complet de la souche étudiée. Les étapes de lavages servent à éliminer les ADNc qui ne se seront pas hybridés et la coloration permet de révéler les ADNc hybridés ainsi que le degré d'expression des gènes. Finalement, les biopuces sont numérisées et les résultats sont analysés à l'aide de différents logiciels. Pour de plus amples détails, se référer au texte.

Les gels sont par la suite colorés à l'aide du Bleu de Coomassie ou du nitrate d'argent [234]. Les résultats sont analysés selon la même procédure que pour la transcriptomique, à l'exception que l'identification des protéines d'intérêt s'effectue par spectrométrie de masse. Pour ce faire, les protéines sont extraites du gel, digérées à l'aide de la trypsine et soumises à la spectrométrie de masse. La séquence en acide aminé des protéines est alors déduite et la comparaison avec les bases de données (National Center for Biotechnology Information et ExPaSy par exemple) permettront de les identifier [235].

2.4.3 Généralités des études transcriptomiques et protéomiques du régulon Pho

Tant au niveau transcriptionnel que protéomique, une carence en phosphate mène à une réponse pléiotropique (Tableau IV en page 38). De manière générale, chez diverses espèces bactériennes, une carence en phosphate entraîne l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du phosphate, le métabolisme énergétique, la réponse générale au stress ainsi que le stress oxydatif. De plus, lorsque les bactéries sont confrontées à cette limitation, la répression des gènes concernent ceux impliqués dans la synthèse protéique, le métabolisme des acides nucléiques, la chémotaxie et la motilité (gènes de flagelle). En plus, la réponse à une limitation de phosphate est aussi spécifique à chaque espèce. Une description globale des différents systèmes mis en place lorsque les bactéries sont confrontées à une carence en phosphate sera effectuée au cours des prochains paragraphes et est résumée dans le tableau IV.

2.4.3.1 *Escherichia coli*

Le régulon Pho est intensivement étudié chez *E. coli*, incluant les études protéomiques et transcriptomiques. Dans un premier temps, VanBogelen *et al.* [135] ont comparé la réponse protéomique de la souche W3110 cultivée en milieu riche et pauvre en phosphate. Une carence en phosphate module l'expression de 413 protéines (208 induites et 205 réprimées). Cependant, cette étude fut réalisée en 1996 et la première séquence d'un génome d'*E. coli* K12 fut publié en 1997 [230], ce qui implique que la majorité des protéines dont l'expression est modulée ne possède aucune correspondance. Malgré cela, cette étude en est une de référence puisqu'elle fut la première analyse globale de la réponse bactérienne à une carence en phosphate. De plus, chacune des protéines modulées au cours de cette expérience possède un numéro correspondant au « response-regulation map » et à la base de données gène-protéine [135, 236], ce qui facilite maintenant leur identification et ce, à l'aide des bases de données.

De leur côté, Baek et Lee [131] ne se sont intéressés qu'aux gènes induits lorsque *E. coli* est confrontée à une carence en phosphate et ce, de la même manière que VanBogelen *et al.* Ainsi, 33 gènes, dont 16 faisant partie du régulon Pho, sont surexprimés lorsque la bactérie était confrontée à une carence en phosphate. Ils ont observé une augmentation de la transcription des gènes codant pour le fimbriae F9 (le gène *ydeS* qui code pour l'adhésine), le système de résistance à l'acidité dépendant du glutamate (les gènes *gadA/BC/E*) et des gènes de fonction inconnue. Dans le but d'identifier de nouveaux membres du régulon Pho, les régions promotrices des gènes surexprimés ont été analysées afin de trouver des boîtes Pho putatives. Afin de confirmer que les gènes possédant une ou des boîtes Pho putatives font bel et bien partie du régulon Pho, des fusions transcriptomiques des régions promotrices des gènes avec la GFP (green fluorescent protein) ont été analysées à l'aide de la souche sauvage et une souche mutante *phoB*- cultivées en milieu carencé en phosphate. Les souches émettant de la fluorescence chez la souche sauvage, mais pas chez le mutant *phoB* est un membre du régulon Pho puisque PhoB est essentiel à sa transcription. Cette étude a donc permis d'identifier trois nouveaux membres du régulon Pho et ceux-ci ne sont pas impliqués dans le métabolisme du phosphate. Ces gènes sont *amn*, *yibD* et *ytfK* et codent respectivement pour une AMP nucléosidase, une glycosyle transférase putative et une protéine hypothétique

2.4.3.2 *Bacillus subtilis*

Chez *B. subtilis*, le régulon Pho est composé d'au moins 33 gènes [237] et possède sensiblement les mêmes fonctions que chez *E. coli*, à savoir un système Pst (PstSCA[BA][BB]), deux phosphatases alcalines (PhoAB), un système à deux composants (PhoPR) répondant aux concentrations de phosphate, etc. Contrairement à *E. coli*, chez laquelle le régulon Pho est contrôlé par un système à deux composants, celui de *B. subtilis* est régulé par l'interaction d'au moins trois systèmes à deux composants [238]. Le principal est PhoPR, orthologue à PhoBR, et est requis dans l'activation ou la répression des gènes du régulon Pho [239]. Le second, ResDE, est impliqué dans l'activation et la répression des gènes impliqués dans la respiration aérobie et anaérobie et est requis pour la pleine induction du

régulon Pho. Le troisième, Spo0A, est impliqué dans l'initiation de la sporulation dans les cas d'une prolongation de la carence en phosphate [237].

Le régulon Pho de *B. subtilis* a été étudié de manière protéomique et transcriptomique. Dans un premier temps, Antelmann *et al.* ont démontré que l'activation du régulon Pho, causée par une carence en phosphate, augmente la synthèse de 45 protéines [224]. Celles-ci font parties du régulon Pho, de la réponse générale au stress dépendant de σ^B (régulon σ^B) et du stress oxydatif. Le régulon σ^B est une réponse non-spécifique au stress et permet la survie bactérienne. Les membres de σ^B protègent l'ADN, les protéines ainsi que les membranes des dommages causés par le stress oxydatif et ils contribuent à la survie bactérienne à des conditions environnementales extrêmes, comme le stress causé par la chaleur, les sels et l'éthanol [240, 241]. De plus, lors d'une carence en phosphate, deux protéines (GlpQ et YdhF) étaient fortement exprimées. En effectuant des transferts Northern et des extensions d'amorces, ils ont montré que les gènes *glpQ* et *ydhF* sont fortement transcrits et que leur promoteur comporte une boîte Pho. La protéine GlpQ code pour une glycérophosphoryl diester phosphodiesterase et est impliquée dans l'hydrolyse des phospholipides déacylés tandis qu'YdhF est une lipoprotéine de fonction inconnue.

Pour sa part, le groupe d'Allenby ont montré que la croissance de *B. subtilis* dans un milieu pauvre en phosphate module la transcription de 93 gènes [225]. De ces 93 gènes, 24 sont surexprimés et 69 sont réprimés. En plus des gènes faisant partie du régulon Pho et de la réponse générale au stress dépendant de σ^B , plusieurs gènes de fonctions inconnues sont surexprimés. De plus, une carence en phosphate entraîne la répression de gènes impliqués dans la synthèse protéique et des acides nucléiques. Une analyse *in silico* des promoteurs des gènes différentiellement exprimés a montré que cinq gènes n'ayant pas été caractérisé comme faisant partie du régulon Pho possédaient une boîte Pho putative. Selon la même procédure que Baek et Lee [131], à l'exception que les promoteurs sont fusionnés à la β -Galactosidase (*lacZ*), Allenby *et al.* [225] ont identifié quatre nouveaux membres du régulon Pho. Ces quatre nouveaux membres sont les gènes *yfKN*, *yjdB*, *yurl*, *vpr*,

qui codent respectivement pour une 2',3' nucléotide cyclique 2-phosphodiesterase, une protéine de fonction inconnue, une RNase et une protéase extracellulaire.

2.4.3.3 *Bacillus licheniformis*

Chez *Bacillus licheniformis*, le régulon Pho a été étudié par transcriptomique et par protéomique [226]. En comparant la réponse transcriptionnelle de la souche sauvage cultivée en milieu carencé et riche en phosphate, Hoi *et al.* [226] ont montré que 98 gènes sont surexprimés tandis que 94 gènes sont réprimés. Les gènes induits codent pour des protéines de fonction inconnue, impliquées dans le transport, la sporulation, le métabolisme énergétique et la survie à des conditions atypiques. Les gènes réprimés, quant à eux, codent pour des protéines de fonction inconnue, impliquées dans le métabolisme des coenzymes, des acides nucléiques, la synthèse protéique ainsi que la chémotaxie et la motilité (flagelles). De la même manière que l'étude transcriptomique, le protéome a révélé que l'activation du régulon Pho entraîne la synthèse de 48 protéines et ce, selon les mêmes tendances que l'étude transcriptomique. Finalement, l'analyse des promoteurs des gènes et/ou des protéines différentiellement exprimés a montré que 29 gènes possèdent une ou des boîtes Pho putatives. Cependant, des preuves expérimentales sont nécessaires afin de valider quels sont les gènes directement régulés par PhoB.

2.4.3.4 *Corynebacterium glutamicum*

Chez *Corynebacterium glutamicum*, l'activation du régulon Pho module la transcription de 92 gènes et ce, entre 10 et 180 min suite à une croissance en un milieu carencé en phosphate [227]. Le regroupement hiérarchique des gènes selon leur profil d'expression a révélé cinq groupes prédominants. Les groupes 1, 2 et 3 concernent des gènes surexprimés impliqués dans le métabolisme du phosphate, du cuivre et dans la dégradation des protocatéchuates (sidérophores). La dégradation des protocatéchuates rend disponible le fer qui y est fixé. D'autre part, les groupes 4 et 5 regroupent des gènes montrant une répression lors d'une carence en phosphate et ceux-ci renferment des gènes impliqués dans la synthèse protéique et dans l'acquisition du fer.

2.4.3.5 *Streptomyces coelicolor*

En comparant la réponse bactérienne à une carence en phosphate entre une souche sauvage de *Streptomyces coelicolor* et son mutant isogénique *phoP* (orthologue de PhoB), il a été montré que 529 gènes sont différentiellement exprimés et ce, selon 12 profils transcriptomique différents [228]. En plus de l'induction des gènes impliqués dans le métabolisme du phosphate, une carence en phosphate entraînait, chez la souche sauvage, l'augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire et la respiration cellulaire passant par la voie des nitrates. De plus, cette carence menait à la répression des gènes reliés à la synthèse des acides aminés et des protéines, la respiration aérobie et la réponse aux stress. L'analyse des promoteurs des gènes et protéines différentiellement exprimés a montré que 125 gènes possédaient une boîte Pho putative. De ces 125 gènes, 5 ont été expérimentalement validés et ce, à l'aide de la technique du retard sur gel. Ces gènes sont : *sco4879*, *sco0034*, *sco2878*, *sco4261* et *sco4262* et codent des protéines hypothétiques.

2.4.3.6 *Sinorhizobium meliloti*

Chez *S. meliloti*, l'activation du régulon Pho, causé par une carence en phosphate, module la transcription de 234 gènes [229]. De ces 234 gènes, 148 sont surexprimés et concernent des gènes impliqués dans le transport du fer, la résistance au stress oxydatif, la biosynthèse d'exopolysaccharides et entraîne, du coup, une modification de la surface bactérienne. Les gènes réprimés, quant à eux, regroupent 86 gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés, la synthèse et le repliement protéique, la chémotaxie, la motilité et certains systèmes de transport du fer. Finalement, l'analyse des promoteurs des gènes différentiellement exprimés a permis d'identifier 17 nouveaux membres potentiels du régulon Pho puisqu'il possède, au niveau de leur promoteur, des boîtes Pho putative. Parmi ceux-ci, 11 furent expérimentalement validés par Yuan *et al.* [136]. La validation des nouveaux membres du régulon Pho a été effectuée de la même manière que celle exposée par Baek et Lee [131], à l'exception que les promoteurs des gènes furent fusionnés à la β -glucuronidase (*gusA*).

2.4.3.7 *Vibrio cholerae*

Chez *V. cholerae*, il a été montré qu'une condition de carence en phosphate modifie la synthèse de 140 protéines (67 surexprimées et 73 réprimées). Les protéines surexprimées codent pour des transporteurs, des protéines hypothétiques, des facteurs transcriptionnels et des protéines impliquées dans la biosynthèse des acides aminés. Pour leur part, les protéines réprimées codent pour des protéines hypothétiques, des transporteurs, des protéines impliquées dans la biosynthèse, la stabilisation et le repliement protéique ainsi que la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire. L'analyse des régions promotrices des gènes codant pour les protéines surexprimées a permis d'identifier neuf gènes possédant des boîtes Pho putatives [223]. Cependant, des preuves expérimentales sont nécessaires afin de déterminer si ces gènes sont sous le contrôle de PhoB.

Il est donc évident que la réponse à une carence en phosphate est pléiotropique et ce, chez toutes les espèces bactériennes étudiées. Une réponse générale semble s'établir tandis qu'une réponse spécifique est retrouvée chez chacune de ces espèces. Cependant, de toutes ces études, seule celle impliquant *V. cholerae* concerne une espèce pathogène.

En terminant, nous avons vu que le régulon Pho n'est pas seulement un système régulationnel impliqué dans l'homéostasie du phosphate, mais fait aussi partie d'un réseau complexe régulant la réponse à différents stress ainsi que la virulence bactérienne. Toutefois, les mécanismes moléculaires reliant le régulon Pho et la virulence ne sont pas connus.

L'identification des gènes et des voies métaboliques modulés par une mutation du système Pst est nécessaire dans la compréhension du rôle de l'activation du régulon Pho dans l'atténuation de la virulence. À ce titre, nous avons entrepris une étude transcriptomique comparative globale entre la souche APEC χ 7122 et son mutant isogénique Pst (K3), où le régulon Pho de la souche χ 7122 était inactif (3 MU) tandis que celui de la souche K3 était actif (200 MU).

SECTION II – Méthodologie et résultats

Article :
Genome-wide transcriptional response of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Pst Mutant.

Sera soumis à BMC Genomics

Implication de l'auteur dans cet article.

En tant que premier auteur de cet article, j'ai écrit la totalité de l'article. J'ai aussi effectué toutes les expérimentations de biopuces, de qRT-PCR ainsi que l'analyse des résultats. Ces expériences forment le cœur de l'article.

Genome-wide transcriptional response of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Pst Mutant

Sébastien Crépin¹, Martin G. Lamarche¹, Philippe Garneau¹, Julie Séguin², Julie Proulx², Charles M. Dozois² and Josée Harel^{1*}

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6; ²Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada,

*Author for correspondence

Josée Harel

Telephone: (450) 773 8521 ext 8233

Fax: (450) 778 8108

e-mail

Keywords : Pho regulon, Pst system, Transcriptomic (Affymetrix), Stress responses

Abstract

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) are associated with extraintestinal diseases in poultry. The *pstSCAB-phoU* operon belongs to the Pho regulon and encodes the phosphate specific transport system (Pst). A functional Pst system is required for full virulence, resistance to serum, to cationic antimicrobial peptides and acid shock. In an effort to understand effect of *pst* mutation on virulence of the APEC strain χ 7122, we undertook a transcript profiling study of its isogenic Pst mutant (K3) grown in phosphate-rich medium. Overall, 471 genes were differentially expressed by at least 1.5-fold in K3 strain. Interestingly, our results show that the Pst mutant does not only induces systems to optimize the acquisition and the bioavailability of phosphate, but also modulates stress response mechanisms. Indeed, the general and stringent stress responses are the major components of the transcriptome's adjustment to the *pst* mutation. A similar proportion of up- and down-regulated genes was involved in oxidative stress response. In accordance, the K3 strain was less resistant to reactive oxygen species (ROS) than the wild-type strain. Additionally, differential expression of some genes coding for cell surface components suggested membrane modification. In regard to this observation, we showed that the K3 strain had less fimbriae (type 1 and F9) at its surface and agglutinated 10-fold less yeast cells when compared to the APEC strain χ 7122. Altogether, our data confirmed our previous suggestion that the Pho regulon is an important part of a complex network being involved in phosphate homeostasis, stress response and bacterial virulence.

Introduction

In *Escherichia coli* and many other bacterial species, the Pho regulon is activated when cells face phosphate limitation, whereas its expression is inhibited in excess of phosphate. The two-component system (TCS) PhoR/PhoB responds to environmental phosphate concentration variations and controls expression of at least 47 genes [1, 2]. PhoR is an inner membrane sensor protein that responds to periplasmic orthophosphate (P_i) concentrations and PhoB is the response regulator of the Pho regulon. PhoR is activated when the P_i concentration is below 4 μ M. In that condition, Phospho-PhoB binds to specific DNA sequences known as Pho-Boxes, which are part of Pho-dependent gene promoters. Then, phospho-PhoB promotes or inhibits the gene transcription. The *pstSCAB-phoU* operon encodes the Pst system and belongs to the Pho regulon. The Pst system encodes an ATP-binding cassette (ABC) transporter involved in the transport of P_i . Importantly, in many bacterial species, mutations in the Pst system result in constitutive expression of the Pho regulon regardless of environmental phosphate availabilities and affects virulence of many pathogenic bacteria [1].

Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains are associated with various diseases, including urinary tract infections (UTIs), newborn meningitis (NBM), abdominal sepsis and septicemia [3]. We have previously showed that inactivation of the *pst* operon in porcine and avian ExPEC strains resulted in constitutive expression of the Pho regulon and rendered the strains avirulent [4, 5]. Moreover, it was reported that the *phoB* gene of the avian pathogenic *E. coli* (APEC) χ 7122 strain is expressed during infection [6]. In accordance, in ExPEC strains, other PhoB regulated genes were shown to be expressed *in vivo* [7, 8]. A number of reports have described an association between the Pst system, the Pho regulon and bacterial virulence [1]. Although inactivation of *pst* genes has been shown to affect the virulence of a number of bacterial pathogens, the mechanisms underlying this attenuation have not been elucidated.

Microarray studies have been conducted to understand how *E. coli* K-12 responds to growth at phosphate-rich or phosphate-limited conditions in *phoB* mutant strains were on rich and minimal media [9, 10]. Moreover, proteome profiles of cells grown

under phosphate-rich or phosphate-limited conditions revealed that the overall phosphate response of *E. coli* could be constituted of up to 400 genes [11]. To understand global responses resulting from a mutation in the Pst system and its relationship with APEC virulence, the transcriptional profile of the APEC χ 7122 strain was compared with its isogenic Pst mutant (K3) using the Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array. The Pho regulon is clearly not a simple regulatory circuit for controlling phosphate homeostasis; it is part of a complex network important for both bacterial virulence and global stress response. Modulation of genes involved in surface modification and production of fimbriae occurring in the Pst APEC mutant contribute to its multiple impaired virulence phenotypes.

Material and Methods

Bacterial strains, media and growth condition

The APEC strain χ 7122, the χ 7122 Δ *pstCAB* mutant (K3), the complemented χ 7122 Δ *pstCAB* mutant (CK3) and the χ 7122 Δ *fim* (χ 7279) strains were previously described [5, 12, 13]. *E. coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. Antibiotics or supplements were used at the following final concentration, when required: 40 µg/ml for nalidixic acid (Nal), 50 µg/ml for kanamycin (Kan), 12.5 µg/ml for chloramphenicol (Cm) and 40 µg/ml for 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate di-sodium (XP).

Alkaline phosphatase assay

Alkaline phosphatase activity was measured as described previously with slight modifications [5]. Briefly, cells grown under different conditions were adjusted to an optical density of 1.0 at 600 nm (OD_{600}), and 4 µg/ml of *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) was added to cells permeabilized by 50 µl of 0.1% SDS and 50 µl of chloroform. Color development was monitored at 420 nm, and alkaline phosphatase activity was expressed in Miller units (MU), calculated as follows: $1,000 \times [OD_{420} - (1.75 \times OD_{550})] / T \text{ (min)} \times V \text{ (ml)} \times OD_{600}$.

RNA isolation

RNA extractions were performed using four biological replicates of χ 7122 and K3 strain cultures. Briefly, overnight cultures were grown at 37°C was diluted 100-fold

into 5 ml of LB broth and were allowed to grow to mid-log phase (OD_{600} 0.6). Cultures were centrifuged and RNAs were isolated by using the RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion, Austin, TX), according to the manufacturer's recommendations, with the exception that the DNase 1 treatment was performed twice. RNA concentration and purity were measured using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop technologies, Wilmington, DE) and the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Quantitative RT-PCR (Smart Cycler from Cepheid, Sunnyvale, CA) was performed on each RNA sample to detect any DNA contamination. For this purpose, primers targeting the *rpoD* gene were used. RNAs were stored at -80°C for future use.

cDNA synthesis and biotinylation

Ten μg of RNA were supplemented with 2 μl of GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) and converted into cDNA using the SuperScript II and random hexanucleotide primers (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. Following cDNAs synthesis, 2 μl of 1 mg/ml of RNase A (Sigma) were added to the reaction mix and incubated at 37°C for 30 min to degrade remaining RNA. cDNAs were purified using Microcon YM-30 centrifugal filter (Milipore, Billerica, MA). Concentration and purity were measured using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. A range between 3 to 7 μg of cDNAs was fragmented using 0.5 U of DNase 1 (Ambion, Austin, TX) and by incubating at 37°C for 10 min. Fragmentation was stopped by heating the reaction mixture at 98°C for 10 min. Fragmented cDNAs were 3' biotinylated using GeneChip DNA Labelling Reagent (Affymetrix, Santa Clara, CA) at 7.5 mM and 60 U of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Promega, Madison, WI) at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by adding 2 μl of 0.5 M EDTA (Sigma). A gel-shift assay on 14 % polyacrylamide gel using ImmunoPure NeutrAvidin (Pierce Chemical, Rockford, IL) was monitored to determine biotin incorporation.

DNA microarray hybridization and analysis

The cDNAs were hybridized onto the Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) as recommended by the manufacturer (www.affymetrix.com). Hybridizations were performed at Génome Québec

Innovation Centre (McGill University, Montréal, Canada). Data were processed using the robust multiarray average algorithm (RMA) for normalization, background correction and expression value calculation [14]. Expression levels obtained from four independent biological replicates were compared using the FlexArray 1.1 software [15]. Robustness of the data was further enhanced by EB (Wright and Simon) algorithm and p-value calculation. Since the RMA algorithm diminished the false positive rate and compressed the fold change, a 1.5-fold change cut-off value was used for the determination of the differentially expressed genes [16]. Functional classification was done according to the TIGR's Comprehensive Microbial Resource (CMR) [17].

Quantitative RT-PCR

The QIAGEN QuantiTect[®] SYBR[®] Green RT-PCR kit was used for qRT-PCR according to the manufacturer's instructions. Primer pairs were designed using the PrimerQuest software from Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) to yield PCR products varying between 80 to 200 bp. The *tus* gene was used as a housekeeping control. Each qRT-PCR run was done in triplicate and for each reaction, the calculated threshold cycle (Ct) was normalized to the Ct of the *tus* gene amplified from the corresponding sample. The fold change was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [18].

***In silico* search for Pho box(es)**

We used the DNA Pattern search program available on the Colibri (© Copyright Institut Pasteur, 1999-2001) website (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>). The search was performed by using the pattern `n[at]!c!c!g[at]!a!g!g!gn!g!g!g[tg][ta][ac]a[tc]nnn!g`, where "n" represents any nucleotide, characters between square brackets "[]" means an ambiguity and "!" before a position indicates the negation of this position. This pattern was designed based on different *E. coli* Pho box sequences taken from Blanco *et al.* [19]. We performed the DNA pattern search through *E. coli* K12 (MG1655) whole genome, with no mismatch allowed, narrowing our search to the 200 bp upstream start codon. We also used the gene list containing predicted PhoB binding sites using the Pho box weight matrix elaborated by Yuan *et al.* [26]. Search

was performed in the MG1655, EDL933, Sakai and CFT073 genomes which are represented onto the Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 array.

Sensitivity of *E. coli* strains to reactive oxygen intermediate (ROI)-generating agents.

Sensitivity to oxidative stress was determined by an agar overlay diffusion method on LB (1.5% agar) as described by Boyer *et al.* [20] with some modifications. Overnight cultures grown in LB broth were adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5. Then, 100 µL of each culture were suspended in molten top agar (0.5% agar) and poured over the agar plates. Filter paper disks (6 mm diameter; Beckton Dickinson) were added to the surface of the solidified overlays and 10 µL of hydrogen peroxide (30%), plumbagin (53 mM), phenazine methosulfate (PMS) (15 mM) or phenazine ethosulfate (PES) (15 mM) were spotted onto the disks. The plates were then incubated overnight at 37°C and following growth the diameters of inhibition zones were measured.

Yeast Cell Aggregation Assay

The yeast cell aggregation assay was performed as previously described [21]. Briefly, commercial baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) was suspended in phosphate-buffered saline (10 mg, dry weight / ml). *E. coli* strains were diluted in phosphate-buffered saline to an OD₆₀₀ of 0.6. Equal volumes of fixed yeast cell suspension and decreasing concentrations of *E. coli* suspension were mixed in a 96-well plate. Aggregation was monitored visually, and the titer was recorded as the smallest dilution of bacteria giving a positive aggregation reaction.

Western blotting

Western blotting was performed as previously described [22]. Briefly, fimbrial extracts were separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-15% polyacrylamide gel electrophoresis minigels as previously described by Laemmli [23]. Proteins were either stained with Coomassie brilliant blue or transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) using a Mini Trans-Blot electrophoretic cell (Bio-Rad) for 60 min at 100 V. The membrane was blocked with StartingBlock supplemented with 0.05% Tween 20 (Pierce). Incubations with primary (1:5,000) and secondary

(1:25.000) antibodies were carried out for 1 h at room temperature. SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) was used for detection.

Electronic microscopy

Cells for electronic microscopy were prepared identically as in microarray experiments. A glow-discharged Formvar-coated copper grid was placed onto a drop of bacterial culture for 1 min to allow the cells to adsorb. The excess of liquid was then removed using a filter paper, just before a drop of 1% phosphotungstic acid (negative stain) was placed onto the grid.

Microarray accession numbers

Microarray data are available at the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) under GSE9178 accession number.

Results and Discussion

Microarray design to identify differentially expressed genes in APEC *pst* mutant

To assess the effects of a *pst* mutation as well as Pho regulon activation on APEC strain χ 7122, a transcriptional profiling approach was used. The strain χ 7122 and its isogenic Pst mutant (K3) were grown in a phosphate-rich (LB) medium. In this condition, both χ 7122 and K3 strains showed similar growth curves, the K3 strain showing no growth defects (data not shown). The alkaline phosphatase activity of PhoA is commonly used to evaluate the activation state of the Pho regulon [24]. The Pho regulon of strains grown at mid-log phase of growth was found to be activated in K3 strain (200 MU), whereas it is repressed in χ 7122 strain (3 MU). Thus, the K3 strain represents a situation where the Pho regulon is highly activated

As first control of our microarray experiments, we hybridized the χ 7122 genome onto the Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array. Among the 20,366 genes represented onto the DNA array, 5751 were shown to be present in the χ 7122 genome (data not shown).

Significant changes in K3 *pst* mutant

The transcriptomic study identified 471 genes that are differentially expressed by at least 1.5-fold in K3 strain when compared to the APEC strain χ 7122, with a p-value of ≤ 0.05 and an estimated false discovery rate (FDR) of 2.71%. Globally, 254 genes were up- and 216 were down-regulated (Table 1 and 2). The known genes of the Pho regulon were induced varying from 145- to 2-fold. Besides those, the *gadW* gene showed the highest induction (6.8-fold), whereas the lowest repression was observed for the *yhcN* gene (-7.8-fold). Functional classification of the differentially expressed genes (Fig. 1) revealed that the dominated responses were those associated in homeostasis and cellular metabolism. Those included, for the up-regulated genes, the unknown function genes, the transport and binding proteins, transcription, energy and central intermediary metabolism functional classes, whereas the down-regulated genes were represented by the unknown function genes, protein fate, DNA metabolism, purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides, cell envelope and protein synthesis functional classes. Although we observed species-specific response to Pho regulon induction, similar expression patterns of genome-wide transcriptional response to phosphate starvation in non-pathogenic *E. coli* [9, 10] were observed. In addition, 5 small RNAs (sRNA) were differentially expressed (Table 1 and 2).

In contrast to the backbone genes, only a small proportion of virulence-associated genes changed significantly in expression when the Pho regulon is activated at mid-log phase of growth. Of these, genes involved in acid and oxidative stress response were modulated. Furthermore, the type 1 and F9 fimbriae were down-regulated in K3 strain. However, majority of the pathogen-associated ORF have an unknown function. They were defined as pathogen-associated ORF since they were present in one of the three pathogenic *E. coli* genomes (EDL933, Sakai and CFT073), but absent in the *E. coli* MG1655 genome. Modulation of these genes could contribute to the K3 strain virulence attenuation observed by Lamarche *et al.* [5].

Blanco *et al.* [19] showed that the C-terminal domain of PhoB interacts with a 22 bp region of dsDNA that consists of two direct repeats of 11 bp. Each 11 bp repeat has a conserved 7 bp region (consensus, CTGTCAT) followed by a less conserved 4 bp

segment. By *in silico* analysis and by using the list of genes identified in *E. coli* genomes by Yuan *et al.* [26], a number of genes with predicted Pho boxes not normally associated with P_i metabolism were identified among the differentially expressed genes. Ninety-one genes or transcriptional units possessed putative Pho box(es), including the known Pho regulon members (Table 1 and 2). In this manner, genes involved in amino acid acquisition (*glnHPQ*, *artJ* and *oppABC*), energy metabolism (*srlAEBD-gutM-srlR-gutQ*, *treA*, *talA*, *ulaABCDEF*, *ulaG* and *glpD*), acid resistance (*gadA* and *gadBC*) and F9 fimbriae biosynthesis (*ydeTSR* and *ydeQ*) possess putative Pho box(es). Distribution of putative Pho regulon members across different functional class confirms the hypothesis that activation of the Pho regulon has a pleiotropic response [1].

Validation of microarray results by qRT-PCR

Validation of microarray results was achieved using qRT-PCR. Fifteen genes representing a wide range of gene expression ratios (5 up-, 8 down-regulated and 2 non-differentially expressed genes) in K3 strain were selected for comparative qRT-PCR analysis. Genes used in experiments are listed in table 3. Comparison of gene expression by microarray hybridizations and qRT-PCR indicated a very high level of concordance between the datasets, which is represented by a correlation coefficient of 0.94 and a Pearson correlation of 0.97 (Fig. 2). We observed that most of the genes belonging to same operon units showed within the unit similar differential expression patterns. Members of the Pho regulon were up-regulated in the K3 strain, including those recently identified such as *amn*, *iciA*, *yibD* and *ytfK* [9, 25]. This is a good indication of the ability of our microarray experiments to identify gene candidates that are affected by a *pst* mutation (Table 1 and 2).

Global stress response

Globally, in order to maintain phosphate homeostasis, the K3 strain shows that not only it reorganizes its cellular metabolism by up-regulating genes encoding scavenging enzymes needed to obtain phosphate from different phosphorylated organic compounds, but also it reorganizes its integral physiological state as demonstrated by changes in expression of genes dealing directly with global stress. Many lines of evidence suggest that the Pho regulon and the stress response are

interrelated [1]. The K3 strain represents an exacerbated situation of bacteria facing phosphate starvation conditions. To deal with this, bacteria rely on different mechanisms to optimize the acquisition and the bioavailability of phosphate and to maintain essential biochemical reactions. In addition, the bacteria mobilize a generalized response circuit.

Transport and binding proteins

In addition to Pho regulon members involved in phosphorous compounds transport, amino acids and oligopeptide were up-regulated in K3 strain. Indeed, the glutamine and the arginine transporter, encoded respectively by the *glnHPQ* operon and by the *artIQM/artJ* genes were up-regulated in K3 strain (1.57- and 1.74-fold, respectively). Down-regulation of the *argR* (-1.57-fold) gene, which encoded the transcriptional repressor of the arginine transporter, was in accordance with the up-regulation of the arginine transporter *artIQM/artJ*. Oligopeptide transporter was also induced in K3 strain. This transporter is encoded by the *oppABCDF* (2.66-fold) operon and can transport small peptide up to five amino acids. Besides their roles in proteins synthesis, amino acids can serve as nitrogen, carbon and ATP sources and they can protect cells from different stress, such as acid stress [27]. Furthermore, the glutamine, arginine and oligopeptide transporters possess putative Pho box(es), which suggest that the amino acid uptake and the Pho regulon are interconnected.

Energy metabolism

Some catabolic genes, which apparently ensure switching to alternative carbon sources, were modulated. In the energy metabolism functional class, the *srlAEBD-gutM-srlR-gutQ* operon, involved in glucitol transport and metabolism and belonging to the phosphoenolpyruvate (PEP): carbohydrate phosphotransferase system (PTS) [28], was induced in K3 strain (4.61-fold). In addition, up-regulation of genes enzymatically linked to the production of fructose-6-phosphate (*talA* and *nagB*) (1.57- and 1.8-fold, respectively), glucose (*melA* and *treA*) (3.71- and 1.67-fold, respectively), metabolism of dihydroxyacetone (*dhaKL*) (1.85-fold) and L-ascorbate (*ulaBDE* and *ulaG*) (2.46-fold) were also induced. These processes participate to glycolysis pathway and intermediate could take part of the tricarboxylic acid cycle. Interestingly, induction of the small regulatory RNA (sRNA) SgrS, known to alleviate

the effects of glucose-phosphate stress [29, 30] was also observed (1.98-fold). To inhibit glucose poisoning produced by production of glycolysis pathway intermediate, the K3 strain inhibits its transport by the glucose-specific PTS.

On the other hand, repression of genes involved in G3P utilization as carbon source, such as the G3P transporter encoded by the *glpTQ* genes (-2.54-fold) and the glycerol-3-dehydrogenase *glpD* (-3.56-fold) was observed. This system is essential for utilization of G3P or its precursors, glycerol and glycerophosphodiester. Since uptake of G3P by the GlpTQ transporter leads to P_i counterflow from the cell and headed to loss of P_i [31], it is not surprising that this system is repressed in K3 strain because G3P is transported, in condition of phosphate starvation, by the Ugp transporter and used as phosphate source [2]. Identification of putative Pho box(es) upstream the *srl* and *ula* operons and *talA*, *treA*, and *ulaG* genes denotes a possible direct connection between glycolysis and the Pho regulon. Furthermore, presence of putative Pho boxes upstream the *glpD* gene suggests that the Pho regulon inhibits the G3P metabolism as carbon source. Thus, the mutation in *pst* can shift fermentation away from glycerol and glucose toward other sugars to optimize the phosphate availability.

Protein fate and synthesis genes

Many genes from the protein fate and synthesis functional classes were down-regulated in K3 strain. Those genes included components of the 30 and 50S ribosomal subunits and many chaperone genes involved in protein fate, such as those of the DnaK system and iron-sulfur cluster assembly. The *dnaKJ* (-3.23-fold), *grpE* (-1.68-fold) and *ibpAB* (-2.63-fold) genes compose the DnaK system. This system is involved in many cytoplasmic events, such as folding of nascent polypeptide chains, rescue of misfolded proteins and assembly and disassembly of protein complexes [32, 33]. Iron-Sulfur cluster plays several role in cellular process, such as iron storage, electron transfer and regulation of enzyme activity and gene expression [34]. Despite its important role, genes involved in Iron-Sulfur cluster assembly were down-regulated in K3 strain. They were represented by *hscAB-fdx* (-1.81-fold) and *iscU* (-1.62-fold) genes. Repression of the DnaK system and Iron-Sulfur cluster assembly genes suggests diminution of cellular processes occurring in

the K3 strain and by a Pho regulon indirect manner since no putative Pho box(es) was observed upstream these genes.

RpoS in *pst* mutant

The Pho regulon, the stringent response and the RpoS regulon are closely related [1]. RpoS is a sigma factor implicated in the cellular response to many stresses. It is also implicated in the stationary phase and the induction of genes in nutrients-limiting environment [35]. The *pst* mutants accumulate RpoS when grown to exponential phase. This phenomenon is dependent on Hfq, a post-transcriptional regulator that interacts with various sRNA, and requires intact PhoB [36]. During exponential phase of growth, in the K3 mutant, *rpoS* gene was not differentially expressed. However, the RpoS-regulatory gene *iraP* was induced 4.2-fold. IraP encodes an anti-adaptor protein that enhances RpoS stability and accumulation by inhibiting its targeting to the ClpXP degradosome [37]. Moreover, the small regulatory RNA (sRNA) *oxyS*, that inhibits the translation of *rpoS* [38], was down-regulated (1.82-fold), like *hfq* (-1.56-fold). Bougdour and Gottesman have recently shown that the transcription of the *iraP* gene is promoted by ppGpp accumulation during phosphate starvation [39]. These results suggest that in the K3 strain, regulation of the sigma factor RpoS does not occur at the transcription level, but could rather occur at the translation and/or protein stability activity. Moreover, 49 genes regulated, among other thing, by the RpoS factor are differentially expressed in K3 strain (Table 1 and 2). In spite of being at mid-log phase of growth, the K3 strain reorganizes its metabolism to face phosphate stress by establishing the general stress response.

Oxidative stress response

In aerobic condition, the cytotoxic by-products of the molecular oxygen metabolism are collectively known as reactive oxygen species (ROS). It is generally thought that the primary endogenous source of ROS is the respiratory chain, namely the NADH dehydrogenase II, which can leak electrons to oxygen, thereby producing superoxide anion radicals ($O_2^{\cdot-}$). Superoxide is normally detoxified through the activities of superoxide dismutases (SodA, SodB and SodC) and catalases (KatE and KatG) dismutate $O_2^{\cdot-}$ in molecular oxygen, hydrogen peroxide (H_2O_2) and eventually to H_2O . However, if they are not rapidly detoxified, superoxide radicals can damage iron-

sulfur clusters in enzymes, thereby releasing Fe^{2+} , which can react with H_2O_2 and produce very reactive hydroxyl radicals ($\text{HO}\cdot$). $\text{HO}\cdot$ can eventually initiate the oxidation of proteins, lipids and DNA [40]. Several genes that belong to the RpoS regulon are involved in defense against oxidative stress (*katE*, *dps*, *sodC* and *xthA*) and/or OxyR (which controls *oxyS*, *katG*, *ahpCF*, *gorA*, *grx*, *dps* and *fur*) and SoxR (which notably controls *sodA*, *nfo* and *fur*) (for a review, see reference [40]). In K3 strain, some genes involved in oxidative stress response were found to be modestly differentially expressed. Among those, the *dps* (DNA protection protein and ferritin-like protein), *sodC* (superoxide dismutase (Cu-Zn)), *grxB* (Glutaredoxin 2), *katE* (catalase) and *sufABCDSE* (Fe-S cluster assembly proteins) genes were up-regulated in K3 strain. The down-regulated genes were represented by the *grxA* (glutaredoxin 1), *trxB* (thioredoxin reductase), *trxC* (thioredoxin 2), *pqiA* (paraquat-inducible protein) and *ybjC* (predicted inner membrane protein). In addition, the sRNA OxyS, regulator that has been proposed to play a role in protecting cells against the damaging effects of elevated hydrogen peroxide concentrations by controlling translation of >40 genes [38, 41], was down-regulated in K3 strain. PhoBR regulon might have an indirect role on most genes involved in the oxidative stress response since major regulators, such as *oxyR* and *SoxRS*, were not differentially expressed in K3 strain.

As expression of some genes whose products exhibit antioxidant activities is modulated, the viability to oxidative stress of K3 cells was tested using different reactive oxygen intermediate (ROI)-generating agents. We used H_2O_2 and various superoxide generators, such as plumbagin, phenazine methosulfate (PMS) and phenazine ethosulfate (PES) to evaluate the antioxidant defense activity of genes of the OxyR and SoxSR regulons. The K3 strain was more sensitive to oxidative stress than the $\chi 7122$ strain and the wild-type strain phenotype was restored in the complemented strain CK3, except for the H_2O_2 challenge (Table 4). These results show that *pst* mutation affects the bacterial resistance to oxidative stress and induction of certain genes implicated in oxidative stress response is not sufficient to confer resistance to this stress. Furthermore, Moreau *et al.* [42, 43] have shown that glucose metabolism and non-growing cells starved for Pi generates oxidative stress that could explain induction of some genes. Since oxidative stress is produced by

host, inability to resist ROS could explain, at least in part, virulence attenuation observed for K3 strain [5].

Acid stress response

The acid fitness island (AFI) contains genes encoding proteins that are known to provide protection against acid stress in *E. coli*. This broad acid response system helps the cell avoid self-imposed acid stresses that occur as a result of fermentation and enables the cell to survive an extreme low pH [44, 45]. The microarray comparisons demonstrate that the expression of the AFI genes increased significantly in K3 strain. This includes the glutamate decarboxylase gene *gadA*, the multiple transcriptional regulator genes that control expression of the glutamate dependent acid resistance (GDAR) system, *gadE*, *gadX* and *gadW*, the latter being highly induced (6.84 fold), the two chaperones *hdeAB*, the multidrug resistance efflux transporter *yhiU* and the transcriptional regulator *yhiF*. In accordance, the *gadBC* operon, which encodes the glutamate-decarboxylase and an antiporter, respectively, were also up-regulated. Regulation of AFI and GDAR system is extremely complex. It is regulated by at least three regulatory circuits, in which participates the EvgAS two-component system and specific transcriptional regulators (GadX, GadW, YdeO, and GadE and RpoS factor) [46]. In K3 strain, regulation of acid resistance gene seems to be executed by *gadX*, *gadW*, *gadE* and maybe RpoS since these genes were up-regulated. Furthermore, effect of Pho regulon in induction of acid resistance gene seems to be indirect since no putative Pho box(es) were found upstream these regulators.

Other groups also report the relationship between the Pho regulon and genes involved in acid stress resistance [9, 10, 47, 48]. Transcriptional activation of the *gadA/BC/E* genes was also observed in *E. coli* W3110 grown in low phosphate media [9, 10]. In spite of the induction of acid stress genes, the K3 strain shows an increased sensitivity to acid stress [5]. It is possible that the already stressed mutant has an increased internal pH due to organic acid produced by the glycolytic pathway [47] and the K3 strain is not able to cope with an external acid stress. Furthermore, cell membrane perturbation could facilitate cytoplasm protonation that ultimately lead to cell death.

Cell membrane components

LPS

In many bacteria, the Pho regulon was shown to be involved in regulation of some cell surface components modifications such as teichuronic acid, phosphate free lipids, phospholipids and exopolysaccharides [1]. Among the differentially expressed genes in K3 strain, 109 encode membrane components. Of these, 54 genes were up- and 55 were down-regulated (Table 1 and 2). Thirty-three genes of the up-regulated genes belong to the transport and binding protein functional class and include members of the Pho regulon showing transcription rate increased by more than 15-fold. Among the down-regulated genes, 7 are involved in lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis including lipid A modification. Indeed, the *rffCDGH* (-1.66-fold) and the *rfaJ* (-1.68-fold) genes, respectively involved in the enterobacterial common antigen (ECA) biosynthesis pathway and LPS-core biosynthesis, were down-regulated. Although we did not observe any changes in O-antigen and/or ECA profiles by SDS-PAGE and Western blot analyses [5, 49], our microarray results suggest that molecular changes could indeed occur within the LPS structure in the K3 strain.

Concerning the lipid A biosynthetic gene expression, the *eptA* and *yeiU* genes (-1.68 and -1.57-fold, respectively), involved in lipid A modification, were also down-regulated. The *eptA* gene is the *Salmonella pmrC* ortholog and is involved in pEtN covalent modification of lipid A [50]. The BasRS two component system that regulates *eptA* gene [50] were also down-regulated (-1.68-fold) in this study. The BasRS is the ortholog of the *pmrAB* gene of *Salmonella* and PmrAB has been shown to be required for resistance to polymyxin B and other microbial compounds [51]. In addition, we have shown that the down-regulation of *yeiU*, recently identified and renamed *lpxT* by Touze and colleagues to be involved in the biosynthetic origin of the lipid A 1-pyrophosphate moiety [52], correlated with diminution of the hexa-acylated 1-pyrophosphate form of lipid A compared to the APEC strain χ 7122 [49]. Raetz *et al.* [53] have proposed that modification of the lipid A might contribute to the fine tuning of the lipopolysaccharide molecule, which is often the target of regulated modifications that might allow adaptive advantages to changing environmental conditions. Their alteration in *pst* mutant could participate to the avirulent phenotypes

observed in *pst* mutants, such as decreased resistance to bactericidal effect of serum, acid and cationic antimicrobial peptides [4, 5, 49]. Furthermore, repression of LPS genes is an example of a strategy used by the bacteria to optimize the P_i availability.

The type 1 fimbriae production is diminished in K3 strain

Fimbriae are adhesive organelles of paramount importance for successful bacterial recognition and colonization of specific host tissues. Genes involved in type 1 and F9 fimbriae biosynthesis were down-regulated in the K3 strain (Table 2). Indeed, genes involved in the type 1 (major type 1 subunit *fimA*, the chaperone *fimC* and the *fimI* gene, whose function is not elucidated) (-2.1 fold) as well as F9 fimbriae biosynthesis (*ydeTSR*, *ydeQ*, *c1936* and *c1935*) (-3.72- to -1.54-fold) were repressed in K3 strain. Type 1 and F9 fimbriae are important virulence factors involved in colonization and biofilm formation [54-58]. In APEC strains, type 1 fimbriae is preferentially expressed in air sacs [59, 60], which are the primary infection site [61]. F9 fimbriae are homologous to type 1 fimbriae but are immunologically and functionally distinct from them [57]. However, the role of F9 in APEC is not known.

In order to correlate the down-regulation of the type 1 and F9 genes with fimbrial production, electronic microscopy was performed onto the χ 7122 strain, the K3 strain and the complemented strain (CK3). Indeed, less fimbriae were observed at the surface of the mutant K3, compared to the wild-type χ 7122 and complemented strain CK3 (Fig. 3 A,B,C). Since type 1 fimbriae adhesin recognizes the D-mannose moieties of receptors [62], yeast cells agglutination was also performed. The K3 strain agglutinated 10-fold less yeast cells than the χ 7122 (Fig. 3D) and CK3 strains when shake and grown at mid-log phase. When cultured statically for 48h, a condition supporting fimbriae production the K3 strain agglutinated 51-fold less than the χ 7122 and CK3 strains (data not shown). Finally, western blot using anti-FimA revealed important reduction of FimA production in K3 strain, compared to χ 7122 and CK3 strains (Fig. 3E).

Several studies have provided evidence that the expression of type 1 fimbriae is altered in response to environmental stress conditions such as high osmolarity, pH

and temperature, and that expression is induced upon entry into stationary phase [63, 64]. Putative Pho box(es) were identified upstream the *ydeT* and *ydeQ* genes, which are involved in F9 fimbriae biosynthesis, whereas no putative Pho box(es) were observed upstream genes involved in type 1 fimbriae biosynthesis. Here we show that the Pst background greatly reduced fimbrial production that could contribute to virulence attenuation of the mutant and PhoBR might have an indirect role in repression of these genes. Thus, in the K3 strain, down-regulation of these adhesins could affect the primary step of colonization in the infection process.

Conclusion

In conclusion, the APEC *pst* mutant represents an exacerbated situation of bacteria facing phosphate starvation conditions. To deal with this, bacteria rely on different mechanisms to optimize the acquisition and the bioavailability of phosphate and to maintain essential biochemical reactions. In addition, the bacteria mobilize a generalized stress response circuit. However, facing the host environment, the mechanisms that participate to its virulence are not adequately expressed and consequently the virulence of the strain is attenuated. Altogether, our data confirmed our previous suggestion that the Pho regulon is an important part of a complex network being involved in phosphate homeostasis, stress response and bacterial virulence.

Acknowledgements

We thank Guillaume Bruant, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, for his technical advices with the microarrays analysis. We are grateful to Turlough M. Finan, McMaster University, for use of the resource of its Pho box weight matrix. We are also grateful to Miria Elias from the NRC-Biotechnology Research Institute for technical assistance with the Agilent 2100 Bioanalyzer. This work was supported in part by grants to J.H. and C.M.D. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Bibliography

1. Lamarche MG, Wanner BL, Crepin S, Harel J: **The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis.** *FEMS Microbiol Rev* 2008, **32**(3):461-473.
2. Wanner BL: **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 American Society for Microbiology, Washington, DC* 1996.
3. Ron EZ: **Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens.** *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**(1):28-32.
4. Daigle F, Fairbrother JM, Harel J: **Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs.** *Infect Immun* 1995, **63**(12):4924-4927.
5. Lamarche MG, Dozois CM, Daigle F, Caza M, Curtiss R, 3rd, Dubreuil JD, Harel J: **Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain.** *Infect Immun* 2005, **73**(7):4138-4145.
6. Dozois CM, Daigle F, Curtiss R, 3rd: **Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(1):247-252.
7. Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockatell CV, Hebel JR, Johnson DE, Tang CM, Donnenberg MS: **Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract.** *Mol Microbiol* 2002, **45**(4):1079-1093.
8. Khan MA, Isaacson RE: **Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection.** *Infect Immun* 2002, **70**(7):3404-3412.
9. Baek JH, Lee SY: **Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*.** *FEMS Microbiol Lett* 2006, **264**(1):104-109.
10. Baek JH, Lee SY: **Transcriptome analysis of phosphate starvation response in *Escherichia coli*.** *J Microbiol Biotech* 2007, **17**(2):244-252.
11. VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC: **Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1996, **178**(15):4344-4366.
12. Marc D, Arne P, Bree A, Dho-Moulin M: **Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*-mutant of an avian strain of *Escherichia coli*.** *Res Microbiol* 1998, **149**(7):473-485.
13. Provence DL, Curtiss R, 3rd: **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* 1992, **60**(11):4460-4467.
14. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP: **A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2003, **19**(2):185-193.

15. Blazejczyk M, M. Miron and R. Nadon.: **FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays.** *Genome Quebec, Montreal, Canada: Genome Quebec, Montreal, Canada, 2007, <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>*
16. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP: **Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31(4):e15.**
17. Peterson JD, Umayam LA, Dickinson T, Hickey EK, White O: **The Comprehensive Microbial Resource.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29(1):123-125.**
18. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25(4):402-408.**
19. Blanco AG, Sola M, Gomis-Ruth FX, Coll M: **Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator.** *Structure* 2002, **10(5):701-713.**
20. Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF: **Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.** *Infect Immun* 2002, **70(11):6032-6042.**
21. Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M, Darfeuille-Michaud A: **The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2007, **282(46):33275-33283.**
22. Lymberopoulos MH, Houle S, Daigle F, Leveille S, Bree A, Moulin-Schouleur M, Johnson JR, Dozois CM: **Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract.** *J Bacteriol* 2006, **188(18):6449-6459.**
23. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227(5259):680-685.**
24. Torriani A: **Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*.** *Biochimica Biophysica Acta* 1960, **38:460-469.**
25. Han JS, Park JY, Lee YS, Thony B, Hwang DS: **PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*.** *Mol Gen Genet* 1999, **262(3):448-452.**
26. Yuan ZC, Zaheer R, Morton R, Finan TM: **Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34(9):2686-2697.**
27. Reitzer L: **Catabolism of Amino Acids and Related Compounds.** *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology Online Version <http://www.ecosal.org/ecosal/indexjsp>* 2005.
28. Deutscher J, Francke C, Postma PW: **How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70(4):939-1031.**
29. Vanderpool CK: **Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10(2):146-151.**
30. Vanderpool CK, Gottesman S: **Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the**

- glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* 2004, **54**(4):1076-1089.**
31. Boos W: **Binding protein-dependent ABC transport system for glycerol 3-phosphate of *Escherichia coli*.** *Methods Enzymol* 1998, **292**:40-51.
 32. Bukau B, Horwich AL: **The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.** *Cell* 1998, **92**(3):351-366.
 33. Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E, Bukau B: **Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation.** *Mol Microbiol* 2003, **50**(2):585-595.
 34. Johnson DC, Dean DR, Smith AD, Johnson MK: **Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters.** *Ann Rev Biochem* 2005, **74**:247-281.
 35. Hengge-Aronis R: **Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**(3):373-395.
 36. Ruiz N, Silhavy TJ: **Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates rpoS translation in an Hfq-dependent fashion.** *J Bacteriol* 2003, **185**(20):5984-5992.
 37. Bougdour A, Wickner S, Gottesman S: **Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*.** *Genes Dev* 2006, **20**(7):884-897.
 38. Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G: **A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator.** *Cell* 1997, **90**(1):43-53.
 39. Bougdour A, Gottesman S: **ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007.
 40. Storz G, Imlay JA: **Oxidative stress.** *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**(2):188-194.
 41. Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S, Storz G: **Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(9):2791-2802.
 42. Moreau PL: **Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions.** *J Bacteriol* 2004, **186**(21):7364-7368.
 43. Moreau PL, Gerard F, Lutz NW, Cozzone P: **Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress.** *Mol Microbiol* 2001, **39**(4):1048-1060.
 44. Hommais F, Krin E, Coppee JY, Lacroix C, Yeramian E, Danchin A, Bertin P: **GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 1):61-72.
 45. Mates AK, Sayed AK, Foster JW: **Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance.** *J Bacteriol* 2007, **189**(7):2759-2768.
 46. Foster JW: ***Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile.** *Nature Rev Microbiol* 2004, **2**(11):898-907.
 47. Moreau PL: **The lysine decarboxylase CadA protects *Escherichia coli* starved of phosphate against fermentation acids.** *J Bacteriol* 2007, **189**(6):2249-2261.

48. Suziedeliene E, Suziedelis K, Garbenciute V, Normark S: **The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon.** *J Bacteriol* 1999, **181**(7):2084-2093.
49. Lamarche MG, S.-H. Kim, S. Crépin, M. Mourez, N. Bertrand, R. E. Bishop, J. D. Dubreuil, and J. Harel: **Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation.** *Submitted to J Bacteriol (MS # JB01536-07)* 2008.
50. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA: **The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*.** *J Bacteriol* 2004, **186**(13):4124-4133.
51. Nishino K, Hsu FF, Turk J, Cromie MJ, Wosten MM, Groisman EA: **Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III).** *Mol Microbiol* 2006, **61**(3):645-654.
52. Touze T, Tran AX, Hankins JV, Mengin-Lecreulx D, Trent MS: **Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate.** *Mol Microbiol* 2007, **67**(2):264-77.
53. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE: **Lipid A modification systems in gram-negative bacteria.** *Ann Rev Biochem* 2007, **76**:295-329.
54. Dziva F, van Diemen PM, Stevens MP, Smith AJ, Wallis TS: **Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 11):3631-3645.
55. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nature Rev Microbiol* 2004, **2**(2):123-140.
56. Schembri MA, Klemm P: **Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel *fimh* variants and ramifications for virulence.** *Infect Immun* 2001, **69**(3):1322-1328.
57. Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI, Schembri MA: **The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 7):2321-2331.
58. van Diemen PM, Dziva F, Stevens MP, Wallis TS: **Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves.** *Infect Immun* 2005, **73**(3):1735-1743.
59. Dozois CM, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Fairbrother JM: **Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*.** *Avian Dis* 1994, **38**(2):231-239.
60. Pourbakhsh SA, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Martineau-Doize B, Fairbrother JM: **Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*.** *Microbial Pathogenesis* 1997, **22**(6):331-341.
61. Barnes HJ, J.-P. Vaillancourt, and W. B. Gross: **Colibacillosis, p. 631-652.** In Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne (ed.), *Diseases of poultry*, 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003.
62. Mulvey MA: **Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Cell Microbiol* 2002, **4**(5):257-271.
63. Gally DL, Bogan JA, Eisenstein BI, Blomfield IC: **Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in**

- Escherichia coli K-12: effects of temperature and media.** *J Bacteriol* 1993, **175**(19):6186-6193.
64. Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT, Beck MT: **Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 2002, **70**(3):1391-1402.

Figures and Tables

Figure 1. Functional classification of the differentially expressed genes. White and black bars represent the up- and down-regulated genes, respectively. The abscissa axis represents the percentage of the functional class according the number of genes up- and down-regulated. For example, 254 genes are up-regulated and among these genes, 60 belong to the transport and binding proteins functional class, which represents 23.62% of the up-regulated genes.

Figure 2. Microarray results validation by qRT-PCR. Five up-regulated genes, eight down-regulated genes and two non-differentially expressed genes are presented. Mean \log_2 ratios of the qRT-PCR experiments are plotted against the mean \log_2 ratios of the microarrays experiments. Numbers on the graph refer to genes listed in table 3.

Figure 3. Production of type 1 and F9 fimbriae by the K3 strain. A, B and C) Electronic microscopy performed onto $\chi 7122$, K3 and CK3 strains, respectively. Images show a typical field of view of bacteria and demonstrated that the K3 strain is afimbriae, compared to the $\chi 7122$ and CK3 strains. Arrow shows fimbriae on cell surface. D) Minimal bacterial concentration allowing yeast agglutination. The $\chi 7122\Delta fim$ ($\chi 7279$) strain was used as negative control and did not show agglutination (data not shown). Asterisks indicate significant differences observed between bacterial concentration of the wild-type $\chi 7122$ and the *pst* mutant strain K3 (*P* value = 0.026) as calculated by an One-way Anova statistical test. No difference was observed between the $\chi 7122$ and the CK3 strains as calculated by a Tukey's multiple comparison test. E) Western blot of purified fimbriae proteins from the $\chi 7122$ (lane 1), K3 (lane 2), CK3 (lane 3) and $\chi 7279$ (lane 4) strains using anti-FimA. These results demonstrated the production inhibition of the FimA subunit of the type 1 fimbriae in K3 and $\chi 7122 \Delta fim$.

Table 1. Up-regulated genes in K3 strain

Functional class and gene name ^{a, b, c, d, e, f}	Operon ^{c, d, e, f, g}	Gene title	Fold change
Transport and binding protein			
<i>artI</i>	<i>artPIQM</i> ^d	Arginine-binding periplasmic protein 1	1.74
<i>artJ</i> ^f		Arginine-binding periplasmic protein 2	1.78
<i>feoB</i>	<i>feoA</i> ^c <i>B</i>	Ferrous iron transport protein	2.19
<i>gadC</i> ^{d, e}	<i>gadB</i> ^{b, e} <i>C</i>	Glutamate:gamma-aminobutyric acid antiporter	2.14
<i>glnH</i> ^f	<i>glnHPQ</i> ^d	Glutamine ABC transporter periplasmic-binding protein	1.57
<i>mdtE</i> ^e	<i>mdtEF</i>	Multidrug resistance efflux transporter	1.64
<i>melB</i>	<i>melAB</i>	Melibiose:sodium symporter	3.71
<i>oppA</i> ^c	<i>oppABCDF</i>	Periplasmic oligopeptide-binding protein	2.66
<i>phnC</i> ^{b, c}	<i>phnCDEFGHIJKLMNOP</i>	Phosphonates transport ATP-binding protein	145.81
<i>phoE</i> ^{b, c}		Outer membrane phosphoprotein	85.15
<i>potE</i>	<i>speF-potE</i>	Putrescine-ornithine antiporter	2.56
<i>pstS</i> ^{b, c}	<i>pstSCAB-phoU</i>	High-affinity phosphate-specific transport system	60.97
<i>srlA</i> ^c	<i>srlAEBD-gutM-srlR</i> ^c <i>-gutQ</i>	PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIC2 component	4.61
<i>ugpB</i> ^{b, c, d}	<i>ugpBAEC</i> ^d <i>Q</i>	sn-glycerol 3-phosphate transport system periplasmic binding protein	40.00
<i>yeaN</i>	<i>yeaNO</i>	Putative amino acid / amine transport protein	2.91
<i>yhiD</i> ^{d, e}		Predicted Mg(2+) transport ATPase inner membrane protein	2.35
Energy metabolism			
<i>dhaK</i>	<i>dhaKLM</i>	Dihydroxyacetone kinase	1.85
<i>grxB</i>		Glutaredoxin 2	1.85
<i>hcp</i>	<i>hcp-hcr</i>	Hydroxylamine reductase	1.63
<i>melA</i>	<i>melAB</i>	Alpha-galactosidase	3.24

Continue on the following page

<i>nagB</i>	<i>nagBACD</i>	Glucosamine-6-phosphate deaminase	1.83
<i>naphH</i>	<i>napFDAGHBC- ccmABCDEF</i>	Quinol dehydrogenase membrane component	2.56
<i>nrfA</i>	<i>nrfABCDEF</i>	Cytochrome c552 / nitrite reductase, formate-dependent	3.74
<i>talA^{c,d}</i>		Transaldolase	1.57
<i>treA^{c,d}</i>		Periplasmic trehalase	1.67
<i>ulaB</i>	<i>ulaA^cCDEF</i>	L-ascorbate-specific enzyme IIB component of PTS	2.46
<i>ulaG</i>		Predicted L-ascorbate 6-phosphate lactonase	2.04
Protein fate			
<i>hdeA^{d,e}</i>	<i>hdeA^{d,e}</i>	Acid-resistance protein	2.10
<i>iraP^{c,d}</i>		Anti-adaptor protein for σ^S stabilization	4.42
Cellular processes			
<i>amn^{b,c}</i>		AMP nucleosidase	6.08
<i>katE^d</i>		Catalase HP11 / hydroperoxidase HP11(III)	1.95
<i>sodC^f</i>		Superoxide dismutase (Cu-Zn)	1.75
<i>ycgV</i>		Predicted adhesin	4.01
Transcription			
<i>chaB</i>	<i>chaBC</i>	Cation transport regulator	1.75
<i>gadE^e</i>		DNA-binding transcriptional activator	3.60
<i>gadX^{d,e}</i>		DNA-binding transcriptional dual regulator	2.15
<i>gadW^{d,e}</i>		DNA-binding transcriptional activator	6.84
<i>iciA^{b,c}</i>		Chromosome replication initiation inhibitor protein	2.00
<i>phoB^{b,c}</i>	<i>phoBR</i>	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with PhoR (or CreC)	36.23
<i>yhiF^e</i>		Predicted transcriptional regulator	1.66

Continue on the following page

Central intermediary metabolism

<i>gadA</i> ^{c, d, e}		Glutamate decarboxylase alpha	2.57
<i>gadB</i> ^{c, d, e}	<i>gadBC</i>	Glutamate decarboxylase beta	4.91
<i>phoA</i> ^{b, c}	<i>phoA-psiF</i>	Alkaline phosphatase	112.67

Cell envelope

<i>yibD</i> ^b		Putative glycosyl transferase	45.95
--------------------------	--	-------------------------------	-------

Fatty acid and phospholipid metabolism

<i>cdh</i>		CDP-diacylglycerol phosphotidylhydrolase	4.28
<i>hdhA</i> ^d		7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	1.52

Unknown function

<i>sufA</i> ^e	<i>sufABCDSE</i>	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein	1.91
<i>phoH</i> ^{b, c}		Conserved protein with nucleoside triphosphate hydrolase domain	5.95
<i>psiE</i> ^{b, c}		Phosphate-starvation-inducible protein	1.84
<i>ytfK</i> ^b		Hypothetical protein	6.65

Regulatory function

<i>dps</i> ^{d, f}		DNA protection during starvation conditions	1.87
<i>isrA</i>		Small antisense RNA	1.64
<i>sgrS</i>		Small antisense RNA	1.98
<i>rybA</i>		Small antisense RNA	1.59
<i>rygC</i>		Small antisense RNA	1.50

^a The first up-regulated gene of the operon is shown, ^b Members of the Pho regulon ^c Indicate presence of Pho box in the gene promoter, ^d Genes belonging to RpoS regulon, ^e Genes involved in acid stress response, ^f Genes involved in oxidative stress response, ^g Genes in bold are up-regulated in K3 strain

Table 2 Down-regulated genes in K3 strain

Functional class and gene name ^{a, b, c, d, e}	Operon ^{b, c, d, e, f}	Gene title	Fold change
Transport and binding protein			
<i>dctA</i>		C4-dicarboxylate transport protein	-2.03
<i>fadL</i>		Long-chain fatty acid outer membrane transporter	-1.69
<i>proV</i>	proVWX	Glycine betaine transporter subunit	-2.30
<i>ydeT</i> ^b	ydeRST	Outer membrane usher protein (fimbriae)	-3.08
Energy metabolism			
<i>aceE</i>	pdhR^{b, c}-aceEF-<i>lpdA</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component	-2.53
<i>fucI</i> ^b	fucPIKUR	L-fucose isomerase	-1.59
<i>glpD</i> ^c		Aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	-3.56
<i>glpE</i> ^b	glpEGR	Thiosulfate sulfurtransferase	-2.04
<i>glpT</i>	glpTQ	sn-glycerol-3-phosphate transporter	-2.54
<i>glpX</i>	glpFKX	Fructose 1,6-bisphosphatase II	-1.51
<i>grxA</i> ^e		Glutaredoxin 1	-2.19
<i>trxB</i> ^{b, c}		Thioredoxin reductase, FAD/NAD(P)-binding	-1.88
<i>trxC</i> ^{b, e}		Thioredoxin 2	-1.87
Protein fate			
<i>c1935</i>		Chaperone protein (F9 fimbriae)	-3.72
<i>dnaK</i>	dnaKJ	Molecular chaperone	-3.23
<i>grpE</i>		Heat shock protein	-1.68
<i>hscB</i>	hscBA-<i>fdx-iscX</i>	Co-chaperone with HscA	-1.81
<i>hslO</i>		Hsp33-like chaperonin	-1.59
<i>hslV</i>	hslVU	ATP-dependent protease peptidase subunit	-2.68
<i>htpG</i> ^b		Heat shock protein 90	-1.91
<i>ibpA</i>	ibpAB	Heat shock chaperone	-2.63
<i>slpA</i> ^d		FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	-1.60

Continue on the following page

Proteins synthesis

<i>dinD</i>		DNA-damage-inducible protein	-1.90
<i>lexA</i>	<i>lexA-dinF</i>	Regulator for SOS regulon	-2.14
<i>nrdA</i>	<i>nrdAB</i>	Ribonucleotide-diphosphate reductase alpha subunit	-1.58
<i>recA</i>	<i>recAX</i>	DNA strand exchange and renaturation, DNA-dependent ATPase, DNA- and ATP-dependent coprotease	-2.07
<i>recN</i>		DNA repair protein / recombination and repair protein	-2.80
<i>rplR</i>	<i>rplNXE-rpsNH-rplFR-rpsE-rpmD-rplO-secY-rpmJ</i>	50S ribosomal protein L18	-1.59
<i>rplW</i>	<i>rpsJ-rplCDWB-rpsS-rplV-rpsC-rplP-rpmC-rpsQ</i>	50S ribosomal protein L23	-1.91
<i>umuD</i>	<i>umuDC</i>	DNA polymerase V, subunit D	-1.72
Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides			
<i>carA^b</i>	<i>carAB</i>	Carbamoyl-phosphate synthase small subunit	-2.02
<i>guaB</i>	<i>guaBA</i>	Inositol-5-monophosphate dehydrogenase	-2.33
<i>purH^b</i>	<i>purHD</i>	Bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase / IMP cyclohydrolase	-3.01
<i>purI</i>		Phosphoribosylformyl-glycineamide synthetase	-3.33
<i>purM</i>	<i>purMN</i>	Phosphoribosylaminoimidazole synthetase	-2.62
<i>pyrL</i>	<i>pyrLBI</i>	Orotate phosphoribosyltransferase	-1.96
Cell envelope			
<i>bcsZ</i>	<i>bcsABZC</i>	Endo-1,4-D-glucanase	-1.58
<i>eptA</i>		Predicted metal dependent hydrolase	-1.68
<i>rfaJ</i>	<i>rfaQGPSBIJYZ-waaU</i>	Lipopolysaccharide 1,2-glucosyltransferase	-1.68
<i>rffC</i>	<i>rfe-rffACDEGHMT-wzxE-wzyE-wzzE</i>	Lipopolysaccharide biosynthesis protein / TDP-fucosamine acetyltransferase	-1.66

Continue on the following page

<i>yeiU</i>	<i>yeiRU</i>	Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	-1.57
Fatty acid and phospholipid metabolism			
<i>fabB</i> ^b		3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase	-1.51
<i>yeE</i> ^b	<i>yeEF</i>	Predicted phosphopantetheinyl transférase	1.53
Transcription			
<i>basR</i>	<i>basRS</i> ^b	DNA-binding response regulator in two-component regulatory system with BasS	-1.68
<i>curl</i>		Curlin genes transcriptional activatory protein	-2.52
<i>glpR</i>	<i>glpEGR</i>	Glycerol-3-phosphate regulon repressor	-1.71
<i>pdhR</i> ^b	<i>pdhR-aceEF-lpdA</i>	Transcriptional regulator for pyruvate dehydrogenase complex	-3.42
<i>rpoD</i>	<i>rpsU-dnaG-rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	-1.65
Cellular processes			
<i>c1936</i>		Type 1 fimbrial protein (homologue)	-3.23
<i>fimA</i> ^c	<i>fimAICDFGH</i>	Major type 1 subunit fimbrin (pilin)	-2.10
<i>ydeQ</i> ^b		Predicted fimbrial-like adhesin protein (F9 fimbriae)	-1.57
<i>ydeT</i> ^b	<i>ydeTSR</i>	Outer membrane usher protein (F9 fimbriae)	-3.08
Regulatory function			
<i>oxyS</i> ^e		Global regulatory RNA	-1.82

^a The first up-regulated gene of the operon is shown, ^b Indicate presence of Pho box in the gene promoter, ^c Genes belonging to RpoS regulon, ^d Genes involved in acid stress response, ^e Genes involved in oxidative stress response, ^f Genes in bold are up-regulated in K3 strain

Table 3. Genes used for microarray validation with qRT-PCR

No.	Gene	Gene title	Microarray Fold change (Log2)	qRT-PCR Fold change (Log2)
1	<i>phoA</i>	Alkaline phosphatase	6.816	7.600
2	<i>gadW</i>	DNA-binding transcriptional activator	2.773	2.303
3	<i>cdh</i>	CDP-diacylglycerol phosphotidylhydrolase	2.099	1.607
4	<i>ycgV</i>	Predicted adhesin	2.022	2.483
5	<i>yddV</i>	Diguanylate cyclase	0.851	0.890
6	<i>ydeQ</i>	Predicted fimbrial-like adhesin	-0.651	-0.573
7	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma factor	-0.640	-1.087
8	<i>curl</i>	Curlin genes transcriptional activatory protein	-1.331	-1.037
9	<i>thiF</i>	Thiamine biosynthesis protein	-2.152	-1.787
10	<i>yhcN</i>	Hypothetical protein	-2.967	-5.680
11	<i>lexA</i>	Regulator for SOS regulon	-1.198	-2.377
12	<i>oxyS</i>	Oxidative stress regulator	-0.864	-1.777
13	<i>hfq</i>	RNA-binding protein	-0.638	-1.340
14	<i>yidB</i>	Hypothetical protein	-0.100	-0.013
15	<i>yeiR</i>	Predicted enzyme	-0.040	0.212

Table 4. Sensitivity of APEC χ 7122 and K3 (*pst* mutant) to oxidative stress generating compounds^a

Strain	LB agar with:			
	Plumbagin ^b	H ₂ O ₂	PES	PMS
χ 7122	8.5±0.1	19.2± 0.2	15± 0.4	15.7±0.4
K3	10.7 ± 0.6^c	23.0± 0.9	19.2±0.5	20.7±0.2
CK3	8.7 ± 0.3	21.9 ± 1.0	15.1±0.3	16.7±0.2

^a Data presented are the means ± the standard deviations of six independent experiments.

^b Compounds used were 10 μ l of plumbagin (53 mM), H₂O₂ (30% vol/vol), phenazine ethosulfate (15 mM) (PES), or phenazine methosulfate (PMS) (15 mM).

^c Values indicated in bold text are significantly different ($P < 0.05$) compared to the mean of the wild-type strain.

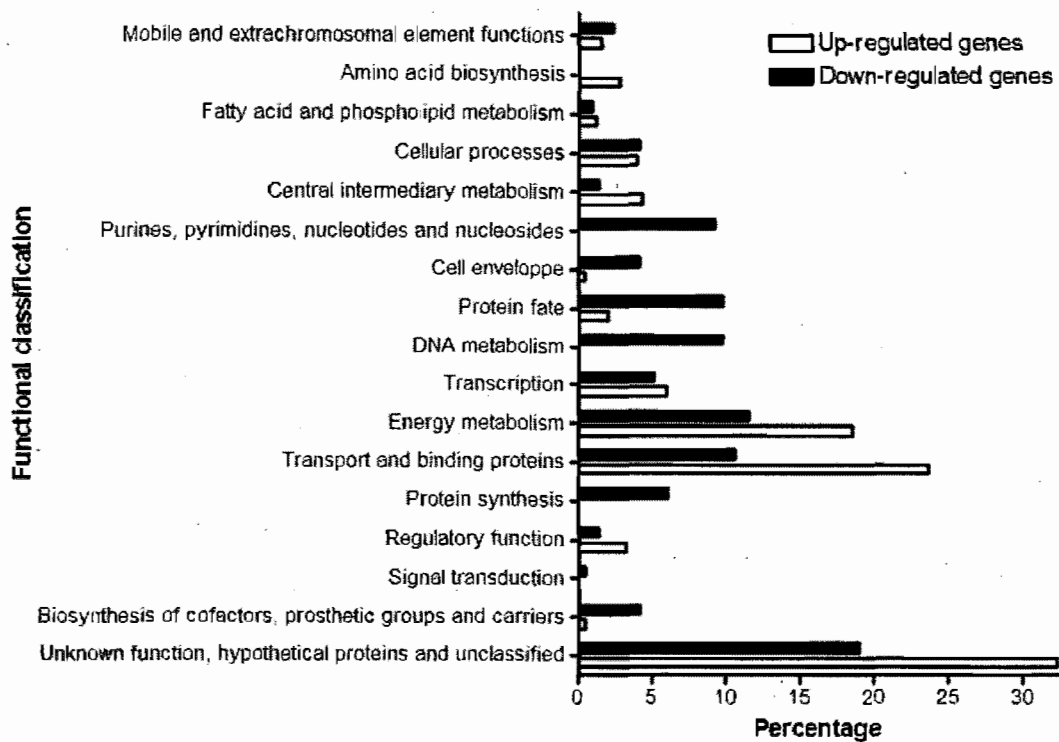


Figure 1

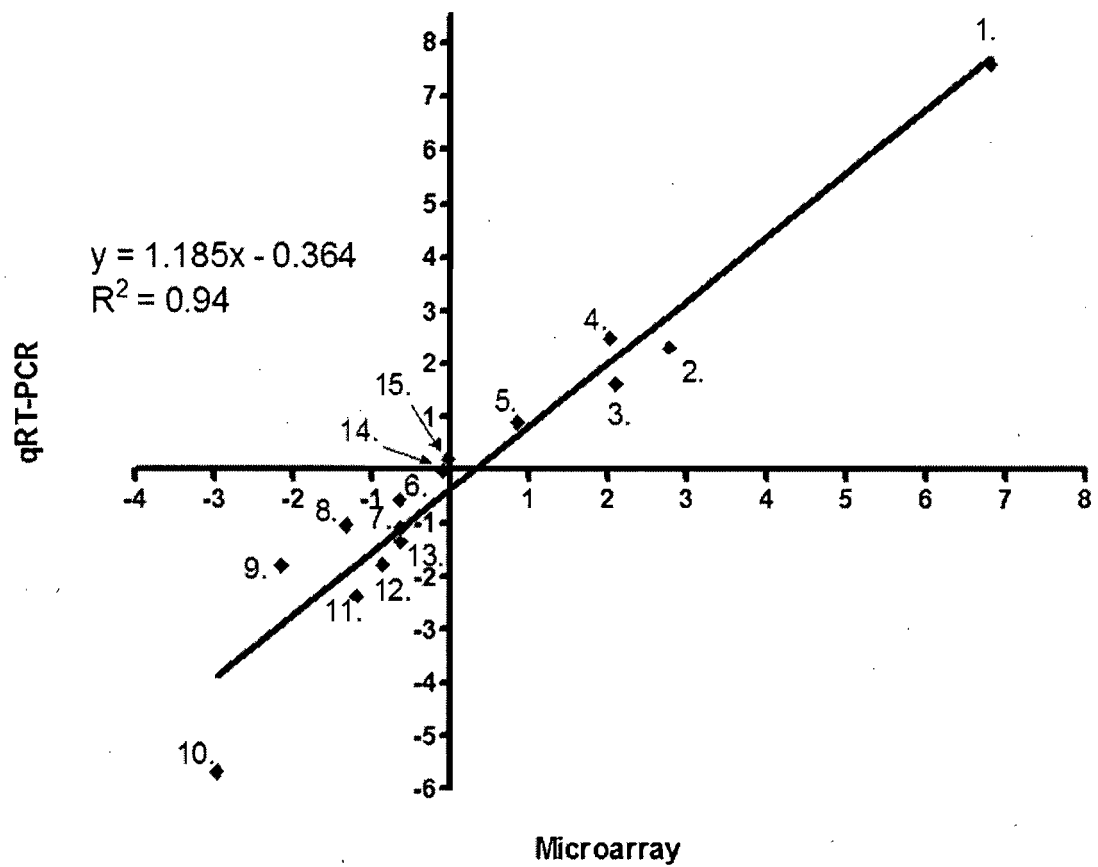
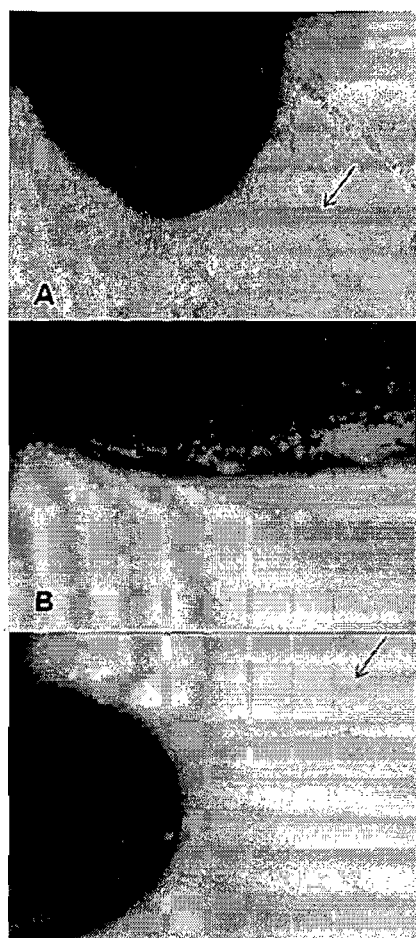


Figure 2.



D Minimal bacterial concentration allowing yeast agglutination

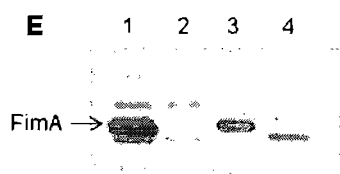
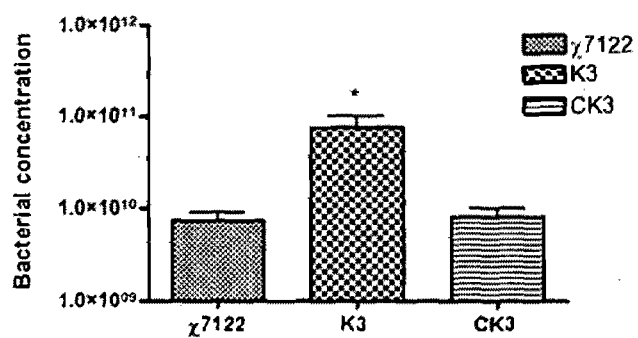


Figure 3.

SECTION III - Discussion

À chacune des étapes d'une infection, les bactéries orchestrent de façon coordonnée l'expression de leurs gènes ainsi que la production de protéines afin de s'adapter aux microenvironnements qu'elles rencontrent, incluant les carences en nutriments. De plus, chacune des espèces bactériennes possèdent des mécanismes spécifiques afin de s'adapter aux disponibilités en phosphate. Les systèmes d'acquisition et de métabolisme du phosphate sont régulés d'une manière à ce que les bactéries puissent survivre à de faibles concentrations en phosphate. Le régulon Pho joue ce rôle primordial dans cette homéostasie [119].

Des mutations dans le système Pst mènent à une activité constitutive du régulon Pho et ce, indépendamment des concentrations du milieu extracellulaire en phosphate [119]. Plusieurs traits associés à la virulence, dont la résistance aux peptides antimicrobiens, à l'acidité et à l'effet bactéricide du sérum sont atténués lorsque le système Pst est muté (inactif) [163, 164, 196]. De plus, la délétion des gènes du système Pst chez diverses espèces bactériennes diminue leur virulence [163-165, 168, 198, 242]. Bien que l'inactivation des gènes composant le système Pst affecte la virulence d'un grand nombre de pathogènes, les mécanismes moléculaires reliant le régulon Pho et la virulence ne sont pas connus. L'identification des gènes modulés par une mutation du système Pst est nécessaire dans la compréhension du rôle de l'activation du régulon Pho dans l'atténuation de la virulence.

3.1 Effet de la mutation *pstCAB* sur la réponse transcriptionnelle

À ce titre, nous avons entrepris une étude transcriptomique comparative globale entre la souche APEC χ 7122 et son mutant isogénique Pst (K3) cultivées en milieu riche en phosphate, où le régulon Pho de la souche χ 7122 était inactif (3 MU) tandis que celui de la souche K3 était actif (200 MU). Ainsi, la mutation Δ *pstCAB* mime un état de carence en phosphate. Cependant, elle représente aussi une réponse exacerbée à cette limitation. En comparant la réponse transcriptionnelle des deux souches, nous avons observé que, chez la souche K3, 471 gènes sont différentiellement exprimés par un facteur d'au moins 1,5. Globalement, chez la souche mutante, l'homéostasie est perturbée et les bactéries réorganisent leur métabolisme cellulaire afin de maintenir l'équilibre homéostatique du phosphate.

Ceci est reflété par la modulation de divers groupements fonctionnels tels le transport, le métabolisme énergétique, la destinée protéique, le métabolisme de l'ADN, etc. (Fig. 1 de l'article à la page 84). En comparant les 471 gènes différentiellement exprimés avec la matrice des boîtes Pho générée par Yuan *et al.* [136], nous observons que 91 gènes possèdent une ou plusieurs boîtes Pho putatives au niveau de leur promoteur. De ceux-ci, 10 (correspondant à un gène seul ou le premier gène d'un opéron) sont caractérisés comme étant membres du régulon Pho. En d'autres termes, nous avons identifié 81 nouveaux membres putatifs du régulon Pho. Leur association avec le régulon Pho est renforcée puisqu'en plus de contenir une ou des boîtes Pho putatives, ces gènes sont différentiellement exprimés chez la souche K3, où le régulon Pho est activé. De plus, ces résultats sont en accord avec la littérature puisqu'il a été démontré que la souche *E. coli* K12 MG1655 possède 107 candidats tandis que la souche entérohémorragique O157:H7 SAKAI en compte 103 [136]. Cependant, plusieurs expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin de valider que ces gènes font bel et bien partie du régulon Pho. Ces expérimentations peuvent passer par la technique du retard sur gel (EMSA), en utilisant la protéine régulatrice PhoB, ou à l'aide de fusions transcriptionnelle aux gènes soupçonnés de posséder des boîtes Pho telles qu'utilisées par Baek et Lee (voir section 2.4.3.1 en page 44 et réf. [131]).

3.2 Validation des résultats des biopuces à ADN à l'aide du qRT-PCR

En plus des gènes connus du régulon Pho qui sont surexprimés chez la souche mutante, qui représente un contrôle positif interne de la transcription, nous avons validé les résultats des biopuces à ADN à l'aide d'une analyse par qRT-PCR. Cette analyse fut effectuée sur 15 gènes qui représentent un large éventail de ratio de variation d'expression [5 gènes surexprimés, 8 gènes réprimés et 2 gènes dont la transcription n'est pas affectée par la mutation (voir tableau III de l'article à la page 82)]. En comparant les résultats du qRT-PCR avec ceux des biopuces à ADN, nous observons une corrélation de 94 %, ce qui confirme que les valeurs obtenues à l'aide des biopuces à ADN sont significatives. De plus, les biopuces à ADN ont été effectuées à l'aide de quatre réplicats biologiques, tandis que les expérimentations de qRT-PCR ont été réalisées avec trois réplicats biologiques et ce,

indépendamment de ceux utilisés pour les biopuces à ADN, ce qui renforce la significativité et la reproductibilité de nos résultats.

3.3 Transport de l'arginine, glutamine et des oligopeptides

Chez la souche K3, le métabolisme cellulaire est réorganisé afin de permettre aux bactéries de maintenir un certain équilibre du contenu en phosphate. Les gènes du régulon Pho sont surexprimés, ce qui n'est pas surprenant puisque la mutation Pst mime un état de carence en phosphate. Ainsi, les bactéries activent les gènes responsables de l'acquisition et du métabolisme de différentes sources de phosphate. De plus, nous observons une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans le transport de la glutamine, l'arginine ainsi que des oligopeptides. Les acides aminés, en plus de leur rôle dans la synthèse protéique, sont une source d'azote, de carbone et d'énergie [243]. L'arginine joue un rôle important dans la formation de la putrescine et dans la résistance à l'acidité [243, 244]. Pour sa part, la glutamine peut être transformée en glutamate et peut participer, elle aussi, à la résistance à l'acidité [244, 245]. Quant à eux, les oligopeptides peuvent être dégradés en acides aminés et par la suite, être utilisés par l'organisme. De cette manière, l'augmentation du transport des acides aminés, chez la souche K3, peut être une source alternative de phosphate, pour la formation de l'énergie (ATP) ou protéger la bactérie de divers stress. Afin de maintenir actives les voies métaboliques, les organismes vivants ont besoin d'énergie, dont l'ATP. Une des voies majeures pour l'obtention d'ATP est la voie de la glycolyse et le cycle de Krebs. Ainsi, la souche K3 surexprime des gènes impliqués dans le transport de sucres et le métabolisme des intermédiaires de la voie de la glycolyse, ce qui maintient active cette voie métabolique.

3.4 Métabolisme énergétique

Pour sa part, le glycérol-3-phosphate (G3P) peut être employé comme source de phosphate ou comme source de carbone (formation d'ATP). Chez la souche mutante, nous observons la répression des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du G3P comme source de carbone. Ce qui n'est pas surprenant puisque la mutation du système Pst mime un état de carence en phosphate. Donc,

afin d'optimiser l'acquisition du phosphate, la souche K3 bloque l'utilisation du G3P comme source de carbone. De plus, le transport du G3P par le transporteur GlpTQ mène à l'export d'une molécule de P_i [246]. Donc, afin d'augmenter l'acquisition du phosphate, la souche K3 réprime l'utilisation du G3P comme source de carbone, mais active son importation pour son utilisation comme source de phosphate.

3.5 Système de chaperonnes et synthèse protéique

Des gènes codant pour le système de chaperonnes DnaK ainsi que ceux codant pour les sous-unités 30 et 50S des ribosomes sont réprimés chez la souche K3. Le système de chaperonne DnaK est impliqué dans divers événements cytoplasmiques comme le repliement des polypeptides, la récupération des protéines mal repliées ainsi que l'assemblage et le fractionnement des complexes protéiques [247-252]. Ce système est impliqué, entre autre, dans la réparation des dommages protéiques causés par divers stress. De plus, la répression des gènes codant pour les sous-unités 30 et 50S des ribosomes peut être corrélée à une diminution de la synthèse protéique. Ainsi, la répression des gènes codant pour des chaperonnes, tout comme les composants ribosomiaux, suggère une diminution des processus cellulaires et du repliement protéique, ce qui peut altérer l'aptitude des bactéries à répondre à divers stress.

3.6 Le régulon Pho, la réponse générale au stress et la réponse stringente

Le régulon Pho, la réponse générale au stress ainsi que la réponse stringente sont intrinsèquement liées [160-162, 175-177, 253]. Chez la souche K3, un total de 49 gènes (10,40 %), sur les 471 différentiellement exprimés, font partie du régulon RpoS. De plus, la modulation des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés et des protéines ainsi que dans le métabolisme des acides nucléiques et des nucléotides suggèrent l'établissement d'une réponse stringente [180] chez la souche K3. Bien que les régulateurs impliqués dans l'établissement de la réponse générale au stress (*rpoS*) et la réponse stringente (*spoT*) ne soient pas différentiellement exprimés suggèrent que le régulon Pho agit de façon post-transcriptionnelle sur ces derniers. Ce qui est le cas pour *rpoS* puisqu'une mutation du système Pst induit sa traduction, tandis que sa transcription n'est pas affectée [177]. De plus, la

surexpression du gène *iraP*, qui code pour une protéine anti-adaptatrice interférant avec la dégradation de RpoS par la machinerie RssB et ClpXP [Fig. 5 de la section 2.3.1 à la page 26 et réf. [175]]. Récemment, Bougdour et Gottesman [160] ont montré que l'accumulation de ppGpp (réponse stringente), lors d'une carence en phosphate, active la transcription d'*iraP* et par conséquent, entraîne l'accumulation de RpoS. La surexpression d'*iraP* chez la souche K3 est concomitante avec l'établissement de la réponse générale au stress, la réponse stringente et l'état d'activation du régulon Pho.

3.7 Composants membranaires

Le régulon Pho est aussi impliqué dans la régulation de gènes responsables de modifications des composants membranaires, c'est-à-dire l'incorporation d'acide téichuronique, de lipides sans phosphate, de phospholipides au niveau des membranes ainsi que la sécrétion d'exopolysaccharides [153-156, 158, 159, 183]. Dans notre étude, un total de 109 gènes codant pour des composants membranaires était modulé chez la souche K3 (54 surexprimés et 55 réprimés). Nos résultats de biopuces à ADN suggèrent qu'une mutation du système Pst influence la structure des LPS et évoquent qu'il y aurait une perturbation membranaire chez la souche K3. Ainsi, les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'antigène commun aux entérobactéries (*rfcDGH*), dans la biosynthèse du cœur oligosaccharidique des LPS (*rfaJ*) ainsi que ceux impliqués dans la modification du lipide A (*eptA* and *yeiU*) sont réprimés. Les modifications du lipide A s'effectuent, notamment, par l'ajout de groupements 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N) et de phosphoéthanolamine (pEtN) au niveau de ce dernier, ce qui réduit la charge nette négative de la molécule et donc, diminue son affinité pour les peptides cationiques antimicrobiens [98, 99, 254]. De plus, ces modifications sont régulées par le système à deux composants PmrAB [101, 255].

Le gène *eptA*, qui est réprimé chez la souche K3, est impliqué dans l'addition de pEtN au niveau du lipide A [59]. De plus, les gènes *basSR*, orthologues de *pmrAB* chez *Salmonella*, sont réprimés chez la souche K3. Le système à deux composants PmrAB est mieux caractérisé chez *Salmonella* et il est requis pour la virulence [101, 256], la résistance aux peptides cationiques et aux ions métalliques [257-259]. Une

étude de mutants Pst chez des souches ExPEC d'origine aviaire et porcine a montré que la forme hexa-acyl 1-pyrophosphate du lipide A est réduite de 66 % chez ces souches [196]. Le gène *yeiU*, un des candidats pouvant être impliqués dans la biosynthèse de la forme 1-pyrophosphate du lipide A, est réprimé chez la souche K3. Récemment, Touze *et al.* [260] ont montré que ce gène est impliqué dans cette modification du lipide A. De plus, les molécules de pEtN et hexa-acyl 1-pyrophosphate contiennent des molécules de phosphate. De cette manière, la répression des gènes *eptA* et *yeiU* peut être une stratégie qu'emploie les bactéries afin d'optimiser la disponibilité du P_i. Étant donné que les LPS protègent les bactéries des stress environnementaux rencontrés chez l'hôte [97-99, 261], les phénotypes observés chez les mutants Pst, tels la diminution de la résistance à l'effet bactéricide du sérum, à l'acidité, la polymyxine B, la cécropine et la vancomycine [163, 164, 197], peuvent être attribués à l'altération des LPS et expliquer, du coup, l'atténuation de la virulence retrouvée chez ces souches.

3.8 Résistance à l'acidité

Afin de survivre chez l'hôte, les bactéries doivent s'adapter à des environnements acides tels le passage dans l'estomac. En plus de provoquer l'agrégation et la dénaturation des protéines, l'acidité entraîne la dépurination de l'ADN et des dommages aux membranes [244]. Chez la souche K3, nous observons la surexpression de gènes impliqués dans la résistance à l'acidité. Ces gènes font partie du système des glutamates décarboxylases ainsi que de l'AFI. De plus, la relation entre le régulon Pho et la résistance à l'acidité a été mise en évidence par d'autres groupes [131, 134, 262, 263]. Ainsi, la surexpression de ces gènes suggère que la souche K3 est autant, sinon plus résistante à l'acidité que la souche χ 7122. Pourtant, comparativement à la souche χ 7122, la souche K3 ne résiste pas à l'acidité [164]. Il a été montré que le catabolisme du glucose, lorsque *E. coli* est confrontée à une carence en phosphate, entraîne la formation d'acides organiques [263]. De cette manière, l'induction des glutamates décarboxylases et de l'AFI, chez la souche K3, peut être due à la voie de la glycolyse puisque la mutation Pst mime un état de carence en phosphate. En plus du stress causé par la mutation, la souche K3 n'est pas apte à faire face à un stress acide externe. Les gènes responsables de la résistance à l'acidité sont donc utilisés afin de combattre les acides organiques

produits au niveau du cytosol, tandis qu'une source externe d'acide a un effet délétère sur la souche et entraîne sa mort. De plus, les phénotypes de sensibilité à l'acidité du mutant Pst peuvent être dues à une perturbation membranaire, ce qui facilite la protonation du cytoplasme et mène ultimement à la mort bactérienne.

3.9 La résistance au stress oxydatif

La respiration aérobie est basée sur le métabolisme de l'oxygène moléculaire. Cependant, les produits du métabolisme de l'oxygène moléculaire sont extrêmement toxiques et sont connus sous le nom d'espèces réactives oxygénées (ROS), qui causent un stress oxydatif. Les bactéries sont continuellement exposées au stress oxydatif puisque la source primaire de ROS est la chaîne respiratoire [188, 189, 264, 265]. Un stress oxydatif est aussi produit par le système immunitaire et l'exposition à des facteurs environnementaux de l'hôte, tel les ions métalliques. Ce stress induit, chez les cellules, des dommages au niveau de l'ADN, des protéines, des membranes et peut donc, entraîner à la mort cellulaire [188]. Afin de résister à la production de ROS, les bactéries expriment des protéines impliquées dans leur détoxification, telles les catalases (KatEG), les superoxydes dismutases (SodABC), les hydroperoxydes réductases (AhpCF), les flavoenzymes glutathiones réductases (GrxABC) et les thiorédoxines réductases (TrxABC).

Chez la souche K3, une proportion similaire des gènes surexprimés et réprimés sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif. D'un côté, les gènes surexprimés sont représentés par la catalase *katE*, la superoxyde dismutase *sodC*, l'opéron *suf* (impliqué dans la biosynthèse des groupements Fer-Soufre ([Fe-S]) et le gène *dps* (gène impliqué dans l'homéostasie du fer et dans la protection de l'ADN lors de conditions de carence en nutriments) tandis que les gènes réprimés sont constitués de l'ARN régulateur *oxyS*, les thiorédoxines réductases *trxB* et *trxC* et les gènes impliqués dans la détoxification du paraquat *pqiA* et *ybjC*. De plus, la modulation des gènes impliqués dans la détoxification des ROS, lorsque les bactéries font face à une carence en phosphate, a été rapportée par d'autres équipes [152, 192, 193, 223, 224, 228, 236]. Nos résultats, ainsi que ceux précédemment signalés, suggèrent que l'activation du régulon Pho inclue la prévention des dommages causés par une carence en phosphate.

Bien que le fer soit un élément essentiel à la vie, il est aussi très problématique puisqu'il participe à la réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$



qui génère des ROS. Afin de contrecarrer cette production, des gènes impliqués dans la chélation du fer sont produits, tels les gènes impliqués dans la biosynthèse des groupements Fer-Soufre et dans le stockage du fer. Dans notre cas, les gènes *dps* et l'opéron *suf* sont surexprimés chez la souche K3.

Même si nous observons une proportion similaire des gènes surexprimés et réprimés impliqués dans la réponse au stress oxydatif, nous avons émis l'hypothèse que la souche K3 est plus sensible au stress oxydatif que la souche $\chi 7122$. Nous avons émis cette hypothèse puisqu'un régulateur clé dans la résistance au stress oxydatif, le sRNA OxyS, est réprimé chez la souche mutante. En plus de son rôle dans la régulation de la réponse au stress oxydatif, OxyS est impliqué dans la réduction des dommages causés à l'ADN [266, 267]. Ainsi, la répression de la transcription d'OxyS pourrait être délétère et mener à la mort cellulaire. Nous avons observé que la souche K3 est plus sensible que la souche $\chi 7122$ lorsque confrontée à différents agents causant un stress oxydatif tel l' H_2O_2 , qui fait appel aux membres du régulon OxyR (en ce qui nous concerne, les gènes *dps*, *suf*, *oxyS*, *grxA*, *trxBC*), et les générateurs d'anions superoxydes tels le phénazine éthosulfate (PES), le plumbagin et le phénazine méthosulfate (PMS), qui font appel aux gènes faisant partie du régulon SoxSR (en ce qui nous concerne, les gènes *dps*, *ubjC* et *pqiA*). Une explication à ces phénotypes est que le sRNA OxyS régule, positivement ou négativement, la traduction d'environ 40 gènes [266, 268], ce qui signifie que les gènes régulés par OxyS peuvent ne pas être différentiellement transcrits, mais plutôt différentiellement traduits. Enfin, ces résultats peuvent être expliqués, en partie, l'atténuation de la virulence de la souche K3 puisqu'un stress oxydatif est produit, entre autre, par l'hôte.

3.10 Biosynthèse des fimbriae de type 1 et F9

Chez la souche K3, les gènes impliqués dans la biosynthèse des fimbriae de type 1 et F9 sont réprimés. De plus, les résultats de biopuces à ADN ont été phénotypiquement validés. Ainsi, l'utilisation de la microscopie électronique a permis

de montrer que la surface de la souche K3 présente moins de fimbriae que la souche χ 7122. Le test d'agglutination aux cellules de levures a, quant à lui, démontré que le mutant Pst agglutine 10 fois moins que la souche sauvage. Le test d'agglutination des levures reflète la propriété d'adhérence des fimbriae de type 1 puisque le D-mannose, le récepteur de ce fimbriae, est présent en grande quantité chez les levures [58]. De plus, un buvardage de type western a montré que la souche K3 ne produit pas la sous-unité majeure (FimA) du fimbriae de type 1.

Une des limitations de notre approche phénotypique est que nous n'avons pas prouvé que le fimbriae F9 n'est pas produit et n'est pas présent au niveau de la membrane de la souche mutante. Quoique la souche K3 possède moins de fimbriae à sa surface, la microscopie électronique ne permet pas de déterminer l'identité du ou des fimbriae présents sur la surface de la souche K3. De plus, le fimbriae F9 n'agglutine pas les levures et nous ne possédions pas d'anticorps dirigés contre ce fimbriae. Cependant, le fimbriae F9 n'est pas bien caractérisé. Par contre, il a été rapporté qu'il est impliqué dans la virulence et la formation des biofilms [57-61].

Étant donné que les fimbriae permettent l'adhésion bactérienne aux cellules de l'hôte et sont requis pour la colonisation et donc, à l'établissement d'une infection, la répression de la production des fimbriae de type 1 et F9 peuvent contribuer au phénotype d'atténuation de virulence observé par Lamarche *et al.* [164]. Cette observation est renforcée par le fait que chez la souche χ 7122, le fimbriae de type 1 est préférentiellement exprimé dans les sacs aériens et les poumons [30, 31], site d'infection primaire de cette souche [269]. De plus, des mutants pour le gène *phoU* du système Pst, chez des souches UPEC, rendent celles-ci atténuées dans leur capacité à coloniser le tractus urinaire de souris [198, 242]. Des mutants *pstS* et *pstC* chez *P. mirabilis* rendent aussi ces souches atténuées dans leur capacité à coloniser le tractus urinaire de souris [199]. Étant donné que ces mutants sont atténués, il serait intéressant d'investiguer le profil d'expression du fimbriae de type 1 chez les souches *pst-* d'*E. coli* CFT073 et *P. mirabilis* lors d'une cinétique d'infection puisque chez celles-ci, ce fimbriae permet l'adhésion bactérienne au niveau de la vessie, le site primaire d'infection des bactéries causant des infections du tractus urinaire [25]. Ainsi, l'activation du régulon Pho chez la souche K3 entraîne la répression des gènes impliqués dans la biosynthèse des fimbriae de type 1 et F9

et peut expliquer, en partie, l'atténuation de virulence des souches mutantes Pst puisque l'infection primaire est abolie. Cependant, les mécanismes moléculaires reliant l'inhibition de l'expression du fimbriae de type 1 par le régulon Pho ne sont pas connus.

Bien qu'il n'y ait pas d'évidence directe de la répression du fimbriae de type 1 par le régulon Pho (absence de boîtes Pho au niveau du promoteur de l'opéron *fim*), il se peut que PhoB active ou réprime un ou des régulateurs impliqués dans la régulation du fimbriae de type 1. Récemment, il a été mis en évidence qu'une augmentation de la concentration intracellulaire du second messenger c-di-GMP entraîne l'inhibition de la production du fimbriae de type 1 [270]. De plus, des expériences préliminaires dans notre laboratoire ont montré que 5 gènes impliqués dans le métabolisme du c-di-GMP (3 impliqués dans l'anabolisme, 1 dans le catabolisme et 1 non caractérisé) sont surexprimés chez la souche K3 dont certains possèdent des boîtes Pho (résultats non montrés). De cette manière, la relation entre l'activation du régulon Pho et la répression du fimbriae de type 1 peut passer par le c-di-GMP. Pour ce faire, des doubles mutants, $\Delta pst \Delta$ gène impliqué dans le métabolisme du c-di-GMP, devrait rétablir le phénotype de la souche sauvage en ce qui a trait à la synthèse du fimbriae de type 1 et les phénotypes s'y rattachant.

À chacune des étapes de l'infection, les bactéries orchestrent de façon coordonnée la transcription de ses gènes afin de s'adapter à chacun des microenvironnements qu'elles rencontrent. Par exemple, l'expression du fimbriae de type 1 permet aux UPEC d'adhérer au niveau de la vessie et promeut l'instauration d'une infection urinaire. De cette manière, l'activation constitutive du régulon Pho, chez la souche K3, altère l'orchestration de différents gènes impliqués dans l'infection et dans l'adaptation à différents stress. Ainsi, les bactéries ne peuvent plus s'adapter aux différents microenvironnements qu'elles rencontrent, ce qui résulte en l'atténuation de virulence retrouvée chez la souche K3.

3.11 Alternative aux antibiotiques

Étant donné que les systèmes de régulation à deux composants sont absents chez les cellules eucaryotes, ils représentent une cible de choix dans le développement

de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques [271, 272]. De cette manière, un nombre de molécules inhibitrices de certains systèmes à deux composants ont été identifiés et ce, par criblage de bibliothèques de molécules synthétiques [272, 273]. Ainsi, le développement de molécules induisant l'expression du régulon Pho peuvent être considérées comme étant des agents thérapeutiques puisque l'activation du régulon Pho altère la virulence. Par contre, il faut demeurer prudent avec cette approche puisque l'activation constitutive du régulon Pho, causée par une mutation du système Pst augmente la virulence d'une souche entéro-invasive d'*E. coli* (EIEC) [274].

3.12 Conclusions

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires reliant la virulence et l'activation du régulon Pho chez les souches ExPEC, nous avons procédé à une étude transcriptomique entre la souche sauvage χ 7122 et son mutant isogénique Pst (K3). La mutation du système Pst mime un état exacerbé d'une carence en phosphate, ce qui est reflété par l'activité constitutive de la phosphatase alcaline PhoA, marqueur de l'état d'activation du régulon Pho.

Globalement, chez le mutant Pst, l'homéostasie est perturbée et le métabolisme cellulaire est réorganisé afin de permettre aux bactéries de s'adapter à un état mimant une carence en phosphate. De cette manière, les gènes impliqués dans l'homéostasie (métabolisme énergétique et intermédiaire, la synthèse protéique et les systèmes de régulation), la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire, l'adhésion bactérienne (fimbriae type 1 et F9) et répondant à divers stress (réponse générale au stress, réponse stringente, oxydatif et acide) sont modulés. Ces résultats montrent que l'activation du régulon est pléiotropique ayant des effets bénéfiques et néfastes pour les bactéries.

Ce travail de transcriptomique a permis de mettre en évidence les différents systèmes mis en place lors de l'activation du régulon Pho chez une souche pathogène. Bien que la virulence du mutant Pst soit affectée, les gènes de virulence de la souche χ 7122 ne semblent pas être affectés par la mutation. Les gènes codant pour les facteurs de survie concernent ceux impliqués dans la résistance à l'acidité

ainsi qu'au stress oxydatif. La répression des gènes codant pour les fimbriae de type 1 et F9 représentent des systèmes directement impliqués dans la virulence chez la souche CFT073. De plus, le fimbriae de type 1 est exprimé *in vivo* au niveau du tractus respiratoire et permettrait l'instauration de l'infection primaire chez la souche χ 7122.

L'identification des facteurs de virulence bactériens, leur rôle dans la pathogénie ainsi que la découverte de molécules prévenant ou contrecarrant leurs actions font l'objet de nombreuses études. Cependant, un facteur de virulence doit, selon le postulat moléculaire de Koch, être absent des souches commensales [275]. Dans le cas qui nous concerne, le système Pst est impliqué dans le transport du phosphate inorganique ainsi que dans son homéostasie, mais il affecte aussi certaines fonctions directement liées à la virulence. De plus, il est présent autant chez les espèces commensales que les souches pathogènes et sa délétion entraîne une perte de virulence des souches pathogènes. Donc, le régulon Pho agit indirectement sur la virulence. Ainsi, nous ne considérons pas le système Pst comme un facteur de virulence puisqu'il est retrouvé chez les souches commensales. De cette manière, la compréhension des systèmes impliqués dans le métabolisme et son rôle dans la survie bactérienne sont autant importants que les facteurs de virulence puisqu'un métabolisme bactérien altéré contribue à l'inadaptation des bactéries à certains microenvironnements.

En terminant, nous avons vu que le régulon Pho n'est pas seulement un système régulationnel impliqué dans l'homéostasie du phosphate, mais fait aussi partie d'un réseau complexe régulant la réponse à différents stress ainsi que la virulence bactérienne.

Perspectives

Dans un avenir rapproché, il serait intéressant de déterminer quels gènes possédant une ou des boîtes Pho putatives sont directement régulés par PhoB. Ainsi, les techniques de retard sur gel (EMSA) et de fusion transcriptionnelle permettrait d'identifier les nouveaux membres du régulon Pho. Enfin, il serait intéressant de quantifier la concentration intracellulaire en c-di-GMP chez la souche K3 afin de

corrélérer cette concentration avec la répression de la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse du fimbriae de type 1. Pour ce faire, des doubles mutants, $\Delta psf \Delta$ gène impliqué dans le métabolisme du c-di-GMP, devraient rétablir le phénotype de la souche sauvage en ce qui a trait à la synthèse du fimbriae de type 1 et les phénotypes s'y rattachant.

SECTION IV - Bibliographie

1. Barnes HJ, J.-P. Vaillancourt, and W. B. Gross: **Colibacillosis**, p. 631–652. In Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne (ed.), **Diseases of poultry**, 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003.
2. La Ragione RM, Woodward MJ: **Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia**. *Res Vet Sci* 2002, **73**(1):27-35.
3. Yogaratnam V: **Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant**. *Vet Rec* 1995, **137**(9):215-217.
4. Dho-Moulin M, Fairbrother JM: **Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)**. *Vet Res* 1999, **30**(2-3):299-316.
5. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH: **Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry**. *Vet Microbiol* 2004, **104**(1-2):91-101.
6. Stordeur P, Bree A, Mainil J, Moulin-Schouleur M: **Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions**. *Microbes Infect* 2004, **6**(7):637-645.
7. Vidotto MC, Muller EE, de Freitas JC, Alfieri AA, Guimaraes IG, Santos DS: **Virulence factors of avian *Escherichia coli***. *Avian Dis* 1990, **34**(3):531-538.
8. Babai R, Blum-Oehler G, Stern BE, Hacker J, Ron EZ: **Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains**. *FEMS Microbiol Lett* 1997, **149**(1):99-105.
9. Gophna U, Barlev M, Seiffers R, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ: **Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells**. *Infect Immun* 2001, **69**(4):2659-2665.
10. Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamela P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR, Nolan LK: **The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes**. *J Bacteriol* 2007, **189**(8):3228-3236.
11. Kariyawasam S, Scaccianoce J, Nolan L: **Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization**. *BMC Microbiol* 2007, **7**(1):81.
12. Gophna U, Oelschlaeger TA, Hacker J, Ron EZ: **Yersinia HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts**. *FEMS Microbiol Lett* 2001, **196**(1):57-60.
13. Eisenstein BI, Jones GW: **The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli***. *Adv Intern Med* 1988, **33**:231-252.
14. Klemm P, Krogfelt KA: **Type 1-fimbriae of *Escherichia coli***. In **Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines** (Klemm, P., ed.), pp. 9–26, CRC Press, Boca Raton, FL. 1994.
15. La Ragione RM, Cooley WA, Woodward MJ: **The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants**. *J Med Microbiol* 2000, **49**(4):327-338.

16. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Haner M, Taschner N, Burkhard P, Aebi U, Muller SA: **Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili.** *J Mol Biol* 2002, **323**(5):845-857.
17. Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P: **Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae.** *Infect Immun* 1990, **58**(6):1995-1998.
18. Lowe MA, Holt SC, Eisenstein BI: **Immunoelectron microscopic analysis of elongation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1987, **169**(1):157-163.
19. Orndorff PE, Falkow S: **Identification and characterization of a gene product that regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1984, **160**(1):61-66.
20. Orndorff PE, Falkow S: **Nucleotide sequence of pilA, the gene encoding the structural component of type 1 pili in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1985, **162**(1):454-457.
21. Russell PW, Orndorff PE: **Lesions in two *Escherichia coli* type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding.** *J Bacteriol* 1992, **174**(18):5923-5935.
22. Hornick DB, Allen BL, Horn MA, Clegg S: **Fimbrial types among respiratory isolates belonging to the family Enterobacteriaceae.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**(9):1795-1800.
23. McMichael JC, Ou JT: **Structure of common pili from *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1979, **138**(3):969-975.
24. Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ: **Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*.** *Science* 1998, **282**(5393):1494-1497.
25. Mulvey MA: **Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Cell Microbiol* 2002, **4**(5):257-271.
26. Schembri MA, Christiansen G, Klemm P: **FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 2001, **41**(6):1419-1430.
27. Schembri MA, Klemm P: **Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimH variants and ramifications for virulence.** *Infect Immun* 2001, **69**(3):1322-1328.
28. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL: **Pathogenic *Escherichia coli*.** *Nature reviews Microbiol* 2004, **2**(2):123-140.
29. Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ: **Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells.** *EMBO J* 2000, **19**(12):2803-2812.
30. Dozois CM, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Bree A, Desautels C, Fairbrother JM: **Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*.** *Avian Dis* 1994, **38**(2):231-239.
31. Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doize B, Dozois CM, Desautels C, Fairbrother JM: **Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens.** *Avian Dis* 1997, **41**(1):221-233.
32. Lane MC, Mobley HL: **Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney.** *Kidney Int* 2007, **72**(1):19-25.
33. Bullitt E, Makowski L: **Structural polymorphism of bacterial adhesion pili.** *Nature* 1995, **373**(6510):164-167.

34. Kuehn MJ, Heuser J, Normark S, Hultgren SJ: **P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips.** *Nature* 1992, **356**(6366):252-255.
35. Leffler H, Svanborg-Eden C: **Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells.** *Infect Immun* 1981, **34**(3):920-929.
36. Nishiyama M, Horst R, Eidam O, Herrmann T, Ignatov O, Vetsch M, Bettendorff P, Jelesarov I, Grutter MG, Wuthrich K *et al*: **Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD.** *EMBO J* 2005, **24**(12):2075-2086.
37. Dozois CM, Pourbakhsh SA, Fairbrother JM: **Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry.** *Vet Microbiol* 1995, **45**(4):297-309.
38. van den Bosch JF, Hendriks JH, Gladigau I, Willems HM, Storm PK, de Graaf FK: **Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains.** *Infect Immun* 1993, **61**(3):800-806.
39. Olsen A, Jonsson A, Normark S: **Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*.** *Nature* 1989, **338**(6217):652-655.
40. Barnhart MM, Chapman MR: **Curli biogenesis and function.** *Annu Rev Microbiol* 2006, **60**:131-147.
41. Olsen A, Arnqvist A, Hammar M, Sukupolvi S, Normark S: **The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 1993, **7**(4):523-536.
42. La Ragione RM, Collighan RJ, Woodward MJ: **Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **175**(2):247-253.
43. La Ragione RM, Sayers AR, Woodward MJ: **The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model.** *Epidemiol Infect* 2000, **124**(3):351-363.
44. Stathopoulos C, Provence DL, Curtiss R, 3rd: **Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters.** *Infect Immun* 1999, **67**(2):772-781.
45. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D: **Type V protein secretion pathway: the autotransporter story.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**(4):692-744.
46. Dozois CM, Dho-Moulin M, Bree A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R, 3rd: **Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region.** *Infect Immun* 2000, **68**(7):4145-4154.
47. Heimer SR, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL: **Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection.** *Infect Immun* 2004, **72**(1):593-597.
48. McPeake SJ, Smyth JA, Ball HJ: **Characterisation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds.** *Vet Microbiol* 2005, **110**(3-4):245-253.

49. Provence DL, Curtiss R, 3rd: **Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain.** *Infect Immun* 1994, **62**(4):1369-1380.
50. Kostakioti M, Stathopoulos C: **Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain.** *Infect Immun* 2004, **72**(10):5548-5554.
51. Klemm P, Christiansen G, Kreft B, Marre R, Bergmans H: **Reciprocal exchange of minor components of type 1 and F1C fimbriae results in hybrid organelles with changed receptor specificities.** *J Bacteriol* 1994, **176**(8):2227-2234.
52. Klemm P, Jorgensen BJ, Kreft B, Christiansen G: **The export systems of type 1 and F1C fimbriae are interchangeable but work in parental pairs.** *J Bacteriol* 1995, **177**(3):621-627.
53. van Die I, Kramer C, Hacker J, Bergmans H, Jongen W, Hoekstra W: **Nucleotide sequence of the genes coding for minor fimbrial subunits of the F1C fimbriae of *Escherichia coli*.** *Res Microbiol* 1991, **142**(6):653-658.
54. Khan AS, Kniep B, Oelschlaeger TA, Van Die I, Korhonen T, Hacker J: **Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 2000, **68**(6):3541-3547.
55. Backhed F, Alsen B, Roche N, Angstrom J, von Euler A, Breimer ME, Westerlund-Wikstrom B, Teneberg S, Richter-Dahlfors A: **Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation.** *The J Biol Chem* 2002, **277**(20):18198-18205.
56. Lymberopoulos MH, Houle S, Daigle F, Leveille S, Bree A, Moulin-Schouleur M, Johnson JR, Dozois CM: **Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract.** *J Bacteriol* 2006, **188**(18):6449-6459.
57. Low AS, Dziva F, Torres AG, Martinez JL, Rosser T, Naylor S, Spears K, Holden N, Mahajan A, Findlay J *et al*: **Cloning, expression, and characterization of fimbrial operon F9 from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** *Infect Immun* 2006, **74**(4):2233-2244.
58. Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI, Schembri MA: **The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 7):2321-2331.
59. Dziva F, van Diemen PM, Stevens MP, Smith AJ, Wallis TS: **Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 11):3631-3645.
60. Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HL: **Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection.** *Infect Immun* 2004, **72**(11):6373-6381.
61. van Diemen PM, Dziva F, Stevens MP, Wallis TS: **Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- genes required for intestinal colonization in calves.** *Infect Immun* 2005, **73**(3):1735-1743.
62. Low AS, Holden N, Rosser T, Roe AJ, Constantinidou C, Hobman JL, Smith DG, Low JC, Gally DL: **Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** *Environ Microbiol* 2006, **8**(6):1033-1047.

63. Braun V: **Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria.** *Int J Med Microbiol* 2001, **291**(2):67-79.
64. Khan MA, Isaacson RE: **Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection.** *Infect Immun* 2002, **70**(7):3404-3412.
65. Tivendale KA, Allen JL, Ginns CA, Crabb BS, Browning GF: **Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 2004, **72**(11):6554-6560.
66. Williams PH: **Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 1979, **26**(3):925-932.
67. Williams PH, Warner PJ: **ColV plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 1980, **29**(2):411-416.
68. Der Vartanian M: **Differences in excretion and efficiency of the aerobactin and enterochelin siderophores in a bovine pathogenic strain of *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 1988, **56**(2):413-418.
69. Bindereif A, Neilands JB: **Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid ColV.** *J Bacteriol* 1983, **153**(2):1111-1113.
70. Carbonetti NH, Williams PH: **A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30.** *Infect Immun* 1984, **46**(1):7-12.
71. Crosa JH: **Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria.** *Microbiol Rev* 1989, **53**(4):517-530.
72. Valvano MA, Crosa JH: **Molecular cloning, expression, and regulation in *Escherichia coli* K-12 of a chromosome-mediated aerobactin iron transport system from a human invasive isolate of *E. coli* K1.** *J Bacteriol* 1988, **170**(12):5529-5538.
73. Baumler AJ, Norris TL, Lasco T, Voight W, Reissbrodt R, Rabsch W, Heffron F: **IronN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*.** *J Bacteriol* 1998, **180**(6):1446-1453.
74. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hartsch T, Gottschalk G, Ron EZ, Funfstuck R, Hacker J: **S-Fimbria-encoding determinant *sfa(I)* is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536.** *Infect Immun* 2001, **69**(7):4248-4256.
75. Dozois CM, Daigle F, Curtiss R, 3rd: **Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(1):247-252.
76. Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, Marrs CF: **Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *ironN*(*E. coli*).** *J Infect Dis* 2002, **185**(10):1521-1524.
77. Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, Jr., Stell AL: **Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *ironN* (*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis.** *Infect Immun* 2000, **68**(5):3040-3047.
78. Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR: **IronN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 2002, **70**(12):7156-7160.

79. Bearden SW, Staggs TM, Perry RD: **An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11.** *J Bacteriol* 1998, **180**(5):1135-1147.
80. Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, Wang J, Liu H, Yang J, Yang F *et al*: **Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(20):4432-4441.
81. Runyen-Janecky LJ, Reeves SA, Gonzales EG, Payne SM: **Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, luc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells.** *Infect Immun* 2003, **71**(4):1919-1928.
82. Sabri M, Leveille S, Dozois CM: **A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide.** *Microbiology* 2006, **152**(Pt 3):745-758.
83. Welch RA, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J *et al*: **Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(26):17020-17024.
84. Zhou D, Hardt WD, Galan JE: ***Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island.** *Infect Immun* 1999, **67**(4):1974-1981.
85. Cascales E, Buchanan SK, Duche D, Kleanthous C, Lloubes R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D: **Colicin biology.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**(1):158-229.
86. Fath MJ, Zhang LH, Rush J, Kolter R: **Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants.** *Biochemistry* 1994, **33**(22):6911-6917.
87. Havarstein LS, Holo H, Nes IF: **The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria.** *Microbiology* 1994, **140** (Pt 9):2383-2389.
88. Riley MA, Wertz JE: **Bacteriocins: evolution, ecology, and application.** *Annu Rev Microbiol* 2002, **56**:117-137.
89. Yang CC, Konisky J: **Colicin V-treated *Escherichia coli* does not generate membrane potential.** *J Bacteriol* 1984, **158**(2):757-759.
90. Gilson L, Mahanty HK, Kolter R: **Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V.** *EMBO J* 1990, **9**(12):3875-3884.
91. Gillor O, Kirkup BC, Riley MA: **Colicins and microcins: the next generation antimicrobials.** *Adv Appl Microbiol* 2004, **54**:129-146.
92. Walburger A, Lazdunski C, Corda Y: **The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB.** *Mol Microbiol* 2002, **44**(3):695-708.
93. Braun V, Patzer SI, Hantke K: **Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution.** *Biochimie* 2002, **84**(5-6):365-380.
94. Taylor PW: **Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria.** *Microbiol Rev* 1983, **47**(1):46-83.
95. Taylor PW: **The mode of C5b-9 attack on susceptible Gram-negative bacteria.** p. 129-138. In *Bacteria, complement and the phagocytoc cell.* Cabello, C. F., and Pruzzo, C. (eds). Springer-Verlag, New York. 1988.

96. Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Jr., Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Seyama Y, Shaw W *et al*: **A comprehensive classification system for lipids.** *J Lipid Res* 2005, **46**(5):839-861.
97. Nikaido H: **Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2003, **67**(4):593-656.
98. Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE: **Lipid A modification systems in gram-negative bacteria.** *Annu Rev Biochem* 2007, **76**:295-329.
99. Raetz CR, Whitfield C: **Lipopolysaccharide endotoxins.** *Annu Rev Biochem* 2002, **71**:635-700.
100. Guina T, Yi EC, Wang H, Hackett M, Miller SI: **A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides.** *J Bacteriol* 2000, **182**(14):4077-4086.
101. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, Miller SI: **PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance.** *Mol Microbiol* 1998, **27**(6):1171-1182.
102. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI: **Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ.** *Science* 1997, **276**(5310):250-253.
103. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, Miller SI: **Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides.** *Cell* 1998, **95**(2):189-198.
104. Burns SM, Hull SI: **Comparison of loss of serum resistance by defined lipopolysaccharide mutants and an acapsular mutant of uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5.** *Infect Immun* 1998, **66**(9):4244-4253.
105. Joiner KA: **Complement evasion by bacteria and parasites.** *Annu Rev Microbiol* 1988, **42**:201-230.
106. Pages JM, Bolla JM, Bernadac A, Fourel D: **Immunological approach of assembly and topology of OmpF, an outer membrane protein of *Escherichia coli*.** *Biochimie* 1990, **72**(2-3):169-176.
107. Sen K, Nikaido H: **Lipopolysaccharide structure required for in vitro trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin.** *J Bacteriol* 1991, **173**(2):926-928.
108. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K: **Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*.** *Bacteriol Rev* 1977, **41**(3):667-710.
109. Rick PD, RP. S: **Enterobacterial Common Antigen and Capsular Polysaccharides, pp. 104-22.** 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 American Society for Microbiology, Washington, DC* 1996.
110. Whitfield C: **Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*.** *Annu Rev Biochem* 2006.
111. Whitfield C, Roberts IS: **Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 1999, **31**(5):1307-1319.
112. Kazatchkine MD, Fearon DT, Austen KF: **Human alternative complement pathway: membrane-associated sialic acid regulates the competition between B and beta1 H for cell-bound C3b.** *J Immunol* 1979, **122**(1):75-81.
113. Kubens BS, Wettstein M, Opferkuch W: **Two different mechanisms of serum resistance in *Escherichia coli*.** *Microb Pathog* 1988, **5**(5):371-379.

114. Stevens P, Huang SN, Welch WD, Young LS: **Restricted complement activation by *Escherichia coli* with the K-1 capsular serotype: a possible role in pathogenicity.** *J Immunol* 1978, **121**(6):2174-2180.
115. Allen PM, Roberts I, Boulnois GJ, Saunders JR, Hart CA: **Contribution of capsular polysaccharide and surface properties to virulence of *Escherichia coli* K1.** *Infect Immun* 1987, **55**(11):2662-2668.
116. Cross AS, Gemski P, Sadoff JC, Orskov F, Orskov I: **The importance of the K1 capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli*.** *J Infect Dis* 1984, **149**(2):184-193.
117. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, 3rd, Brown PK, Arne P, Bree A, Desautels C, Fairbrother JM: **Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity.** *Infect Immun* 2003, **71**(1):536-540.
118. Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, 3rd, Lehoux B, Fairbrother JM: **Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages.** *Infect Immun* 2003, **71**(1):494-503.
119. Wanner BL: **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 American Society for Microbiology, Washington, DC* 1996.
120. Willsky GR, Malamy MH: **Control of the synthesis of alkaline phosphatase and the phosphate-binding protein in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1976, **127**(1):595-609.
121. Willsky GR, Malamy MH: **Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1980, **144**(1):356-365.
122. Metcalf WW, Wanner BL: **Involvement of the *Escherichia coli* phn (psiD) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi.** *J Bacteriol* 1991, **173**(2):587-600.
123. Harris RM, Webb DC, Howitt SM, Cox GB: **Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2001, **183**(17):5008-5014.
124. Rao NN, Torriani A: **Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 1990, **4**(7):1083-1090.
125. Higgins CF: **ABC transporters: from microorganisms to man.** *Annu Rev Cell Biol* 1992, **8**:67-113.
126. Surin BP, Rosenberg H, Cox GB: **Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships.** *J Bacteriol* 1985, **161**(1):189-198.
127. Oganessian V, Oganessian N, Adams PD, Jancarik J, Yokota HA, Kim R, Kim SH: **Crystal structure of the "PhoU-like" phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*.** *J Bacteriol* 2005, **187**(12):4238-4244.
128. Steed PM, Wanner BL: **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* 1993, **175**(21):6797-6809.
129. Liu J, Lou Y, Yokota H, Adams PD, Kim R, Kim SH: **Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters.** *J Biol Chem* 2005, **280**(16):15960-15966.

130. Kubena BD, Luecke H, Rosenberg H, Quioco FA: **Crystallization and x-ray diffraction studies of a phosphate-binding protein involved in active transport in *Escherichia coli***. *J Biol Chem* 1986, **261**(17):7995-7996.
131. Baek JH, Lee SY: **Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli***. *FEMS Microbiol Lett* 2006, **264**(1):104-109.
132. Blanco AG, Sola M, Gomis-Ruth FX, Coll M: **Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator**. *Structure* 2002, **10**(5):701-713.
133. Kim SK, Kimura S, Shinagawa H, Nakata A, Lee KS, Wanner BL, Makino K: **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* 2000, **182**(19):5596-5599.
134. Suziedeliene E, Suziedelis K, Garbenciute V, Normark S: **The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon**. *J Bacteriol* 1999, **181**(7):2084-2093.
135. VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC: **Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli***. *J Bacteriol* 1996, **178**(15):4344-4366.
136. Yuan ZC, Zaheer R, Morton R, Finan TM: **Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria**. *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(9):2686-2697.
137. Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Nakata A: **Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12**. *J Mol Biol* 1986, **190**(1):37-44.
138. Scholten M, Tommassen J: **Topology of the PhoR protein of *Escherichia coli* and functional analysis of internal deletion mutants**. *Mol Microbiol* 1993, **8**(2):269-275.
139. Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM: **Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC***. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, **83**(20):7850-7854.
140. Parkinson JS, Kofoid EC: **Communication modules in bacterial signaling proteins**. *Annu Rev Genet* 1992, **26**:71-112.
141. Shinagawa H, K. Makino, M. Yamada, M. Amemura, T. Sato, and A. Nakata.: **Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli*: dual functions of PhoR as a protein kinase and a protein phosphatase**, p. 285-289. In A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver (ed.), *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, D.C. 1994.
142. Makino K, M. Amemura, S.-K. Kim, A. Nakata, and H. Shinagawa.: **Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli***, p. 5-12. In A. Torriani-Gorini, E. Yagil, and S. Silver (ed.), *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, D.C. 1994.
143. Volz K: **Structural conservation in the CheY superfamily**. *Biochemistry* 1993, **32**(44):11741-11753.
144. Wanner BL: **Gene regulation by phosphate in enteric bacteria**. *J Cell Biochem* 1993, **51**(1):47-54.

145. Makino K, Amemura M, Kawamoto T, Kimura S, Shinagawa H, Nakata A, Suzuki M: **DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase.** *J Mol Biol* 1996, **259**(1):15-26.
146. Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A: **Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins.** *J Mol Biol* 1989, **210**(3):551-559.
147. Lamarche MG, Wanner BL, Crépin S, Harel J: **The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis.** *FEMS Microbiol Rev* 2008, **32**(3):461-473.
148. Wanner BL: **Phosphorus assimilation and its control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 152-163.** In G. Hauska and R. Thauer (ed.), *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag, Heidelberg. 1990.
149. Cox GB, Webb D, Godovac-Zimmermann J, Rosenberg H: **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* 1988, **170**(5):2283-2286.
150. Han JS, Park JY, Lee YS, Thony B, Hwang DS: **PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*.** *Mol Gen Genet* 1999, **262**(3):448-452.
151. Danhorn T, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR, Fuqua C: **Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system.** *J Bacteriol* 2004, **186**(14):4492-4501.
152. Yuan ZC, Zaheer R, Finan TM: **Phosphate limitation induces catalase expression in *Sinorhizobium meliloti*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens*.** *Mol Microbiol* 2005, **58**(3):877-894.
153. Lahooti M, Harwood CR: **Transcriptional analysis of the *Bacillus subtilis* teichuronic acid operon.** *Microbiology* 1999, **145** (Pt 12):3409-3417.
154. Liu W, Hulett FM: **Comparison of PhoP binding to the *tuaA* promoter with PhoP binding to other Pho-regulon promoters establishes a *Bacillus subtilis* Pho core binding site.** *Microbiology* 1998, **144** (Pt 5):1443-1450.
155. Muller JP, An Z, Merad T, Hancock IC, Harwood CR: **Influence of *Bacillus subtilis* phoR on cell wall anionic polymers.** *Microbiology* 1997, **143** (Pt 3):947-956.
156. Qi Y, Hulett FM: **Role of Pho-P in transcriptional regulation of genes involved in cell wall anionic polymer biosynthesis in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 1998, **180**(15):4007-4010.
157. Allenby NE, Watts CA, Homuth G, Pragai Z, Wipat A, Ward AC, Harwood CR: **Phosphate starvation induces the sporulation killing factor of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2006, **188**(14):5299-5303.
158. Gonin M, Quardokus EM, O'Donnol D, Maddock J, Brun YV: **Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*.** *J Bacteriol* 2000, **182**(2):337-347.
159. Wagner JK, Setayeshgar S, Sharon LA, Reilly JP, Brun YV: **A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(31):11772-11777.
160. Bougdour A, Gottesman S: **ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP.** *Proc Natl Acad Sci U S America* 2007.

161. Spira B, Silberstein N, Yagil E: **Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi.** *J Bacteriology* 1995, **177**(14):4053-4058.
162. Spira B, Yagil E: **The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*.** *Mol Gen Genet* 1998, **257**(4):469-477.
163. Daigle F, Fairbrother JM, Harel J: **Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs.** *Infect Immun* 1995, **63**(12):4924-4927.
164. Lamarche MG, Dozois CM, Daigle F, Caza M, Curtiss R, 3rd, Dubreuil JD, Harel J: **Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain.** *Infect Immun* 2005, **73**(7):4138-4145.
165. Batisson I, Guimond MP, Girard F, An H, Zhu C, Oswald E, Fairbrother JM, Jacques M, Harel J: **Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*.** *Infect Immun* 2003, **71**(8):4516-4525.
166. Monds RD, Silby MW, Mahanty HK: **Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2.** *Mol Microbiol* 2001, **42**(2):415-426.
167. Monds RD, Newell PD, Gross RH, O'Toole GA: **Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA.** *Mol Microbiol* 2007, **63**(3):656-679.
168. Runyen-Janecky LJ, Boyle AM, Kizzee A, Liefer L, Payne SM: **Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*.** *Infect Immun* 2005, **73**(3):1404-1410.
169. Lopez-Lara IM, Gao JL, Soto MJ, Solares-Perez A, Weissenmayer B, Sohlenkamp C, Verroios GP, Thomas-Oates J, Geiger O: **Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth.** *Mol Plant Microbe Interact* 2005, **18**(9):973-982.
170. von Kruger WM, Humphreys S, Ketley JM: **A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization.** *Microbiology* 1999, **145** (Pt 9):2463-2475.
171. Hengge-Aronis R: **Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**(3):373-395, table of contents.
172. Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R: **Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*.** *Can J Microbiol* 1998, **44**(8):707-717.
173. Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R: **Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity.** *J Bacteriol* 2005, **187**(5):1591-1603.
174. Hengge-Aronis R, Lange R, Henneberg N, Fischer D: **Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 1993, **175**(1):259-265.
175. Bougdour A, Wickner S, Gottesman S: **Modulating RssB activity: *IraP*, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*.** *Genes Dev* 2006, **20**(7):884-897.

176. Schurdell MS, Woodbury GM, McCleary WR: **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* 2007, **189**(3):1150-1153.
177. Ruiz N, Silhavy TJ: **Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates *rpoS* translation in an Hfq-dependent fashion.** *J Bacteriol* 2003, **185**(20):5984-5992.
178. Moll I, Leitsch D, Steinhauser T, Blasi U: **RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein.** *EMBO Rep* 2003, **4**(3):284-289.
179. Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S: **Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays.** *Genes Dev* 2001, **15**(13):1637-1651.
180. Chatterji D, Ojha AK: **Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling.** *Curr Opin Microbiol* 2001, **4**(2):160-165.
181. Magnusson LU, Farewell A, Nystrom T: **ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*.** *Trends Microbiol* 2005, **13**(5):236-242.
182. Paul BJ, Berkmen MB, Gourse RL: **DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(22):7823-7828.
183. Geiger O, Rohrs V, Weissenmayer B, Finan TM, Thomas-Oates JE: **The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*.** *Mol Microbiol* 1999, **32**(1):63-73.
184. Lamarche MG, Wanner BL, Crepin S, Harel J: **The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis.** *FEMS Microbiol Rev* 2008, **32**(3):461-473.
185. D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB, Pesci EC: **Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants.** *J Bacteriol* 2002, **184**(23):6481-6489.
186. Drenkard E, Ausubel FM: ***Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation.** *Nature* 2002, **416**(6882):740-743.
187. Tischler AD, Camilli A: **Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation.** *Mol Microbiol* 2004, **53**(3):857-869.
188. Seib KL, Wu HJ, Kidd SP, Apicella MA, Jennings MP, McEwan AG: **Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, **70**(2):344-361.
189. Storz G, Imlay JA: **Oxidative stress.** *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**(2):188-194.
190. Jamet A, Kiss E, Batut J, Puppo A, Herouart D: **The *kata* catalase gene is regulated by OxyR in both free-living and symbiotic *Sinorhizobium meliloti*.** *J Bacteriol* 2005, **187**(1):376-381.
191. Nakjarung K, Mongkolsuk S, Vattanaviboon P: **The *oxyR* from *Agrobacterium tumefaciens*: evaluation of its role in the regulation of catalase and peroxide responses.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **304**(1):41-47.
192. Moreau PL, Gerard F, Lutz NW, Cozzzone P: **Non-growing *Escherichia coli* cells starved for glucose or phosphate use different mechanisms to survive oxidative stress.** *Mol Microbiol* 2001, **39**(4):1048-1060.
193. Moreau PL: **Diversion of the metabolic flux from pyruvate dehydrogenase to pyruvate oxidase decreases oxidative stress during**

- glucose metabolism in nongrowing *Escherichia coli* cells incubated under aerobic, phosphate starvation conditions. *J Bacteriol* 2004, **186**(21):7364-7368.
194. Harel J, Forget C, Ngeleka M, Jacques M, Fairbrother JM: **Isolation and characterization of adhesin-defective TnphoA mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K:F165.** *J Gen Microbiol* 1992, **138**(11):2337-2345.
195. Ngeleka M, Harel J, Jacques M, Fairbrother JM: **Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity.** *Infect Immun* 1992, **60**(12):5048-5056.
196. Lamarche MG, Kim K, Crépin S, Mourez M, Bertrand N, Bishop RE, Dubreuil JD, Harel J: **Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation.** *Soumis à J Bacteriol* 2008.
197. Lamarche MG, Harel J: **Growth Phase-dependent Membrane Perturbations Occur in an *Escherichia coli* Phosphate Specific Transport (Pst) Mutant Strain** *Soumis à J Bacteriol* 2008.
198. Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockatell CV, Hebel JR, Johnson DE, Tang CM, Sonnenberg MS: **Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract.** *Mol Microbiol* 2002, **45**(4):1079-1093.
199. Burall LS, Harro JM, Li X, Lockatell CV, Himpel SD, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HL: ***Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold.** *Infect Immun* 2004, **72**(5):2922-2938.
200. Jacobsen SM, Lane MC, Harro JM, Shirliff ME, Mobley HL: **The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, **52**(2):180-193.
201. Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY: **Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis.** *Infect Immun* 2003, **71**(3):1343-1351.
202. Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Didembourg C, Taminiau B, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Tang CM, Letesson JJ: **Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*.** *Mol Microbiol* 2000, **38**(3):543-551.
203. Hunt TA, Kooi C, Sokol PA, Valvano MA: **Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival in vivo.** *Infect Immun* 2004, **72**(7):4010-4022.
204. Grant AJ, Coward C, Jones MA, Woodall CA, Barrow PA, Maskell DJ: **Signature-tagged transposon mutagenesis studies demonstrate the dynamic nature of cecal colonization of 2-week-old chickens by *Campylobacter jejuni*.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(12):8031-8041.
205. Gaynor EC, Wells DH, MacKichan JK, Falkow S: **The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes.** *Mol Microbiol* 2005, **56**(1):8-27.
206. McKean S, Davies J, Moore R: **Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction.** *Microbes Infect* 2005, **7**(13):1352-1363.

207. Zhao Y, Blumer SE, Sundin GW: **Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue.** *J Bacteriol* 2005, **187**(23):8088-8103.
208. Yang S, Perna NT, Cooksey DA, Okinaka Y, Lindow SE, Ibekwe AM, Keen NT, Yang CH: **Genome-wide identification of plant-upregulated genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 using a GFP-based IVET leaf array.** *Mol Plant Microbe Interact* 2004, **17**(9):999-1008.
209. Dubail I, Berche P, Charbit A: **Listeriolysin O as a reporter to identify constitutive and in vivo-inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes*.** *Infect Immun* 2000, **68**(6):3242-3250.
210. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL: **Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model.** *Mol Microbiol* 2005, **58**(4):1054-1073.
211. Talaat AM, Lyons R, Howard ST, Johnston SA: **The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(13):4602-4607.
212. Valdivia RH, Falkow S: **Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells.** *Science* 1997, **277**(5334):2007-2011.
213. Faucher SP, Porwollik S, Dozois CM, McClelland M, Daigle F: **Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(6):1906-1911.
214. Runyen-Janecky LJ, Payne SM: **Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment.** *Infect Immunity* 2002, **70**(8):4379-4388.
215. Polissi A, Pontiggia A, Feger G, Altieri M, Mottl H, Ferrari L, Simon D: **Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*.** *Infect Immun* 1998, **66**(12):5620-5629.
216. Hava DL, Camilli A: **Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors.** *Mol Microbiol* 2002, **45**(5):1389-1406.
217. Marra A, Asundi J, Bartilson M, Lawson S, Fang F, Christine J, Wiesner C, Brigham D, Schneider WP, Hromockyj AE: **Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis.** *Infect Immun* 2002, **70**(3):1422-1433.
218. Merrell DS, Hava DL, Camilli A: **Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*.** *Mol Microbiol* 2002, **43**(6):1471-1491.
219. Darwin AJ, Miller VL: **Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis.** *Mol Microbiol* 1999, **32**(1):51-62.
220. Lathem WW, Crosby SD, Miller VL, Goldman WE: **Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(49):17786-17791.
221. Mantis NJ, Winans SC: **The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence.** *J Bacteriol* 1993, **175**(20):6626-6636.
222. Kocan M, Schaffer S, Ishige T, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF, Bott M: **Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion**

- analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* 2006, **188**(2):724-732.
223. von Kruger WM, Lery LM, Soares MR, de Neves-Manta FS, Batista e Silva CM, Neves-Ferreira AG, Perales J, Bisch PM: **The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence.** *Proteomics* 2006, **6**(5):1495-1511.
224. Antelmann H, Scharf C, Hecker M: **Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis.** *J Bacteriol* 2000, **182**(16):4478-4490.
225. Allenby NE, O'Connor N, Pragai Z, Ward AC, Wipat A, Harwood CR: **Genome-wide transcriptional analysis of the phosphate starvation stimulon of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2005, **187**(23):8063-8080.
226. Hoi le T, Voigt B, Jurgen B, Ehrenreich A, Gottschalk G, Evers S, Feesche J, Maurer KH, Hecker M, Schweder T: **The phosphate-starvation response of *Bacillus licheniformis*.** *Proteomics* 2006, **6**(12):3582-3601.
227. Ishige T, Krause M, Bott M, Wendisch VF, Sahn H: **The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses.** *J Bacteriol* 2003, **185**(15):4519-4529.
228. Rodriguez-Garcia A, Barreiro C, Santos-Beneit F, Sola-Landa A, Martin JF: **Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a *DeltaphoP* mutant.** *Proteomics* 2007, **7**(14):2410-2429.
229. Krol E, Becker A: **Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011.** *Mol Genet Genomics* 2004, **272**(1):1-17.
230. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF *et al*: **The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12.** *Science* 1997, **277**(5331):1453-1474.
231. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW: **Quantitative real-time RT-PCR--a perspective.** *J Mol Endocrinol* 2005, **34**(3):597-601.
232. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
233. Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW: **Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods.** *Anal Biochem* 2000, **285**(2):194-204.
234. O'Farrell PH: **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J Biol Chem* 1975, **250**(10):4007-4021.
235. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M: **Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.** *Anal. Chem* 1996, **68**(5):850-858.
236. VanBogelen RA, Abshire KZ, Pertsemliadis A, Clark RL, Neidhardt. FC: **Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12, edition 6, p. 2067-2117.** In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. 1996.

237. Pragai Z, Harwood CR: **Regulatory interactions between the Pho and sigma(B)-dependent general stress regulons of *Bacillus subtilis*.** *Microbiology* 2002, **148**(Pt 5):1593-1602.
238. Hulett FM: **The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*.** *Mol Microbiol* 1996, **19**(5):933-939.
239. Hulett FM, Lee J, Shi L, Sun G, Chesnut R, Sharkova E, Duggan MF, Kapp N: **Sequential action of two-component genetic switches regulates the PHO regulon in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 1994, **176**(5):1348-1358.
240. Gaidenko TA, Price CW: **General stress transcription factor sigmaB and sporulation transcription factor sigmaH each contribute to survival of *Bacillus subtilis* under extreme growth conditions.** *J Bacteriol* 1998, **180**(14):3730-3733.
241. Hecker M, Volker U: **Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon.** *Mol Microbiol* 1998, **29**(5):1129-1136.
242. Buckles EL, Wang X, Lockett CV, Johnson DE, Donnenberg MS: **PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract.** *Microbiology* 2006, **152**(Pt 1):153-160.
243. Reitzer L: **Catabolism of Amino Acids and Related Compounds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology Online Version** <http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp> 2005.
244. Foster JW: ***Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile.** *Nature reviews Microbiol* 2004, **2**(11):898-907.
245. Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD: **EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(Database issue):D334-337.
246. Boos W: **Binding protein-dependent ABC transport system for glycerol 3-phosphate of *Escherichia coli*.** *Methods Enzymol* 1998, **292**:40-51.
247. Deuerling E, Schulze-Specking A, Tomoyasu T, Mogk A, Bukau B: **Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins.** *Nature* 1999, **400**(6745):693-696.
248. Diamant S, Ben-Zvi AP, Bukau B, Goloubinoff P: **Size-dependent disaggregation of stable protein aggregates by the DnaK chaperone machinery.** *J Biol Chem* 2000, **275**(28):21107-21113.
249. Goloubinoff P, Mogk A, Zvi AP, Tomoyasu T, Bukau B: **Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(24):13732-13737.
250. Laskowska E, Wawrzynow A, Taylor A: **IbpA and IbpB, the new heat-shock proteins, bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracellularly by heat shock.** *Biochimie* 1996, **78**(2):117-122.
251. Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E, Bukau B: **Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation.** *Mol Microbiol* 2003, **50**(2):585-595.
252. Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU: **Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains.** *Cell* 1999, **97**(6):755-765.

253. Taschner NP, Yagil E, Spira B: **A differential effect of sigmaS on the expression of the PHO regulon genes of Escherichia coli.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 9):2985-2992.
254. Trent MS: **Biosynthesis, transport, and modification of lipid A.** *Bioche Cell Biol* 2004, **82**(1):71-86.
255. Lee H, Hsu FF, Turk J, Groisman EA: **The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in Salmonella enterica.** *J Bacteriol* 2004, **186**(13):4124-4133.
256. Zhao Y, Jansen R, Gaastra W, Arkesteijn G, van der Zeijst BA, van Putten JP: **Identification of genes affecting Salmonella enterica serovar enteritidis infection of chicken macrophages.** *Infect Immun* 2002, **70**(9):5319-5321.
257. Nishino K, Hsu FF, Turk J, Cromie MJ, Wosten MM, Groisman EA: **Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the Salmonella PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III).** *Mol Microbiol* 2006, **61**(3):645-654.
258. Roland KL, Martin LE, Esther CR, Spitznagel JK: **Spontaneous pmrA mutants of Salmonella typhimurium LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence.** *J Bacteriol* 1993, **175**(13):4154-4164.
259. Wosten MM, Kox LF, Chamnongpol S, Soncini FC, Groisman EA: **A signal transduction system that responds to extracellular iron.** *Cell* 2000, **103**(1):113-125.
260. Touze T, Tran AX, Hankins JV, Mengin-Lecreux D, Trent MS: **Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate.** *Mol Microbiol* 2007.
261. Fridrich E, Whitfield C: **Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae.** *J Endotoxin Res* 2005, **11**(3):133-144.
262. Baek JH, Lee SY: **Transcriptome analysis of phosphate starvation response in Escherichia coli.** *J Microbiol Biotech* 2007, **17**(2):244-252.
263. Moreau PL: **The lysine decarboxylase CadA protects Escherichia coli starved of phosphate against fermentation acids.** *J Bacteriol* 2007, **189**(6):2249-2261.
264. Gonzalez-Flecha B, Demple B: **Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1995, **270**(23):13681-13687.
265. Imlay JA, Fridovich I: **Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1991, **266**(11):6957-6965.
266. Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G: **A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator.** *Cell* 1997, **90**(1):43-53.
267. Gonzalez-Flecha B, Demple B: **Role for the oxyS gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1999, **181**(12):3833-3836.
268. Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S, Storz G: **Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(9):2791-2802.
269. Gross WB: **Colibacillosis, p. 138-44.** In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW Jr, eds. *Diseases of poultry*. Ames, IO: Iowa State University Press, 1991.

270. Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov DA, Gomelsky M, Darfeuille-Michaud A: **The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2007, **282**(46):33275-33283.
271. Barrett JF, Goldschmidt RM, Lawrence LE, Foleno B, Chen R, Demers JP, Johnson S, Kanojia R, Fernandez J, Bernstein J *et al*: **Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(9):5317-5322.
272. Stephenson K, Hoch JA: **Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms.** *Curr Med Chem* 2004, **11**(6):765-773.
273. Matsushita M, Janda KD: **Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents.** *Bioorganic Med Chem* 2002, **10**(4):855-867.
274. Sinai AP, Bavofil PM: **Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*.** *Mol Microbiol* 1993, **10**(5):1125-1137.
275. Falkow S: **Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity.** *Rev Infect Dis* 1988, **10** Suppl 2:S274-276.