

Université de Montréal

**Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de  
souches d'*Escherichia coli* pathogènes causant des maladies  
extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface  
bactérienne**

par

MARTIN LAMARCHE

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires, option microbiologie

Octobre, 2007

©Martin Lamarche, 2007



SF

607

U54

2008

V.001

## AVIS

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

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  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches  
d'*Escherichia coli* pathogènes causant des maladies extra-intestinales  
(ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne**

présentée par

MARTIN LAMARCHE

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

**Dre France Daigle**  
Président rapporteur

**Dr Michaël Mourez**  
Représentant du doyen de la FÉS

**Dre Josée Harel**  
Directrice de recherche

**Dr Daniel Dubreuil**  
Codirecteur

**Dr Mario Jacques**  
Membre du jury

**Dr Rolf Morosoli**  
Examineur externe  
INRS-Institut Armand Frappier



# RÉSUMÉ

Ce travail porte sur l'étude du rôle du régulon Pho dans la virulence de souches d'*Escherichia coli* pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne. Le régulon Pho, contrôlé par le système à deux composantes (TCS) PhoR/PhoB, est un circuit génétique impliqué essentiellement dans l'acquisition du phosphate. Il est induit en situation de carence environnementale en phosphate. Chez les souches d'*E. coli* ayant une mutation dans Pst, un système de transport spécifique du phosphate, le régulon Pho est activé de façon continue. Les souches ExPEC animales O115 et O78 causent d'importantes pertes économiques au sein de l'industrie porcine et avicole respectivement. Notre groupe de recherche a démontré qu'une mutation dans Pst, chez une souche ExPEC O115, a des effets pléiotropiques et résulte en la perte de la virulence.

Notre laboratoire s'intéresse aux bases moléculaires qui pourraient expliquer ces phénomènes. Notre hypothèse est qu'une conséquence d'une mutation dans le système Pst provoque des changements au niveau de la composition des structures de la surface bactérienne qui seraient associées à certains traits de virulence. Le présent projet visait à identifier des composantes de la surface bactérienne affectées par une mutation dans Pst. De plus, nous voulions vérifier si les souches ExPEC O115 et O78, d'origines animales distinctes, sont affectées de façon similaire par une mutation dans Pst. Parmi les effets recensés, nous voulions déterminer lesquels peuvent être associés à la virulence bactérienne.

La virulence de souches O115 et O78 ainsi que de leur mutant Pst fut évaluée dans des modèles d'infection expérimentale. Les résultats obtenus démontrent que, chez ces souches, la capacité à causer des lésions extra-intestinales ainsi que la virulence est fortement atténuée par une mutation dans Pst. De plus, nos résultats démontrent que les mutants Pst sont sensibles au choc acide, à l'effet bactéricide du sérum et aux peptides cationiques antimicrobiens (CAMP). Ces conditions représentent des stress pouvant être rencontrés dans l'hôte. La surface des bactéries à Gram-négatif agit comme une barrière face aux différents stress environnementaux. De façon plus spécifique, le lipide A, la partie membranaire des lipopolysaccharides (LPS), est impliqué dans la résistance au CAMP. Nos résultats montrent qu'il y a une diminution de 66% dans la quantité de lipide A hexa-acyle-1-pyrophosphate chez les mutants Pst. La diminution des pontages croisés entre les LPS, engendré par cette modification, pourrait contribuer à la sensibilité des mutants Pst vis-à-vis le sérum et les CAMP. Par ailleurs, nos résultats démontrent qu'une augmentation de la perméabilité de la membrane externe ainsi que des changements au niveau de la composition des acides gras membranaires contribuent à la sensibilité des mutants Pst au choc acide.

En conclusion, les souches ExPEC O115 et O78 sont affectées de façon similaire par une mutation dans Pst. De plus, les modifications de la surface bactérienne identifiées chez ces mutants peuvent être associées à des phénotypes de sensibilité. Ces phénomènes surviennent sans doute en conséquence de l'état d'activation continue du régulon Pho chez les mutants *pst*. Donc, le régulon Pho appartient vraisemblablement à un réseau beaucoup plus vaste de régulation, important à la fois pour l'homéostasie du phosphate, la virulence bactérienne et la réponse aux stress. Finalement, des

molécules pharmaceutiques induisant cet état d'activation pourraient être utiles comme agents thérapeutiques pour compromettre la virulence bactérienne et faciliter l'élimination des pathogènes par les défenses de l'hôte.

**Mots clés :** ExPEC, régulon Pho, TCS, système Pst, LPS, lipide A, acides gras, CAMP, choc acide, sérum.

# **ABSTRACT**

This work concerns the role of the Pho regulon in the virulence of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains as well as its influence on the bacterial cell surface. The Pho regulon is controlled by the two-component regulatory system PhoR/PhoB. It is the major gene circuit involved in adaptation to phosphate limitation. The Pst system is involved in phosphate specific transport. A mutation in Pst results in a constitutive expression of the Pho regulon. The ExPEC strains O115 and O78 cause important economical loss in the swine and poultry industry respectively. Our research group showed that in an O115 strain, a mutation in the Pst system results in pleiotropic effects and virulence loss.

Our laboratory is interested in elucidating the molecular basis behind these phenomena. We hypothesized that a mutation in the Pst system results in structural changes of the cell surface components. Thus, this project was to characterize cell surface structures using Pst mutants of ExPEC strains O115 and O78. We aimed to establish if a Pst mutation has similar effects on ExPEC strains from distinct animal origins and to determine which effects can be correlated to bacterial virulence.

The virulence of Pst mutants was evaluated in experimental infection models. We showed that a mutation in Pst results in an important virulence attenuation, including a decreased capacity to cause extra-intestinal lesions, in both O115 and O78 strains. Moreover, we showed that Pst mutants are sensitive to the bacteriolytic effects of serum, to cationic antimicrobial peptides (CAMP) and to acid shock. These stresses can be encountered within the host. The cell surface of Gram-negative bacteria acts as a major barrier to many environmental cues. More specifically, the lipid A which is the membrane anchor of the lipopolysaccharides (LPS), is a known structure involved in CAMP resistance. Our lipid A analyses, revealed a 66% reduction in the amount of the hexa-acylated 1-pyrophosphate lipid A in Pst mutants. This lipid A modification could contribute to serum and CAMP sensitivity by reducing cross-bridging between LPS molecules. In addition, our results showed that increased outer-membrane permeability as well as changes in fatty acids composition is likely to contribute to acid shock sensitivity in Pst mutants.

In conclusion, we showed that ExPEC strains O115 and O78 are similarly affected by a mutation in Pst. The phenotypes identified in this study confirmed that Pst mutants are indeed characterized by cell surface structural changes. Moreover, our results showed that the Pho regulon, which is constitutive in *pst* mutants, is involved in some of these modifications. Thus, the Pho regulon might be included in a more global network of regulation affecting phosphate homeostasis, bacterial virulence and stress responses. Finally, drugs that induce the expression of the Pho regulon may also be useful as therapeutic agents that would compromise bacterial virulence and facilitate elimination of the pathogen by host defences.

**Key words:** ExPEC, Pho regulon, TCS, Pst system, LPS, lipid A, Fatty acids, CAMP, acid shock, serum.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATION.....</b>	<b>xviii</b>
<b>DÉDICACE.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xxiv</b>
<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>xxv</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>4</b>
1. Comment les bactéries perçoivent les stimuli environnementaux.....	5
1.1 Les systèmes à deux composantes (TCS).....	6
2. Le phosphate et la vie.....	6
2.1 <i>Escherichia coli</i> et le phosphate.....	7
2.2 Le stimulon phosphate.....	8
2.3 Le régulon Pho .....	9
2.3.1 <i>Généralités sur le régulon Pho</i> .....	9
2.3.1.1 <i>Organophosphates et phosphonates</i> .....	11
2.3.1.2 <i>La phosphatase alcaline PhoA et la porine PhoE</i> .....	12
2.3.2 <i>Le système de transport spécifique du phosphate (Pst)</i> .....	12
2.3.2.1 <i>Les gènes pstSCAB-phoU</i> .....	12
2.3.2.2 <i>Le transporteur PstSCAB</i> .....	13
2.3.3 <i>Le système à deux composantes PhoR/PhoB : domaine et mécanisme du phospho-relais entre PhoR et PhoB</i> .....	15
2.3.3.1 <i>L'histidine kinase PhoR</i> .....	15
2.3.3.2 <i>Le régulateur de la réponse PhoB</i> .....	17
2.3.3.3 <i>Modèles moléculaires d'activation et de répression du régulon Pho</i> .....	18
2.3.3.4 <i>L'activation continue du régulon Pho chez les mutants Pst</i> .....	19

2.3.4	<i>Les boîtes Pho</i> .....	20
2.3.5	<i>La protéine PhoU</i> .....	21
2.3.6	<i>Les systèmes Pit et autres systèmes pour l'acquisition du Pi</i> .....	22
2.3.7	<i>Réflexion sur les mécanismes de contrôle du régulon Pho</i> ...	23
2.3.8	<i>La régulation croisée entre les TCS</i> .....	26
2.3.9	<i>Importance biologique du « cross-talk »</i> .....	27
2.3.10	<i>Activation stochastique de l'expression génique</i> .....	27
3.	<i>La paroi des bactéries à Gram-négatif</i> .....	29
3.1	<i>Structure globale de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif</i> .....	30
3.2	<i>Les lipopolysaccharides (LPS)</i> .....	31
3.2.1	<i>Structure globale des LPS</i> .....	31
3.2.2	<i>Le lipide A : structure prototype du lipide A chez E. coli et Salmonella Typhimurium</i> .....	33
3.2.3	<i>L'activité immunostimulatrice du lipide A</i> .....	34
3.2.4	<i>L'importance des LPS pour la stabilité de la membrane externe</i> .....	36
3.3	<i>La capsule ou antigènes K</i> .....	36
3.3.1	<i>Les capsules polysaccharidiques de groupe 1 et 4</i> .....	37
3.3.2	<i>Les capsules polysaccharidiques de groupe 2 et 3</i> .....	38
4.	<i>Trois stress que la bactérie peut rencontrer chez l'hôte : les mécanismes de résistance dus aux structures de la surface bactérienne</i> .....	39
4.1	<i>Effet bactériolytique du sérum</i> .....	39
4.1.1	<i>La capsule et la résistance à l'effet bactériolytique du sérum</i> .....	39
4.1.2	<i>Les LPS et la résistance à l'effet bactériolytique du sérum</i> .....	41
4.1.3	<i>Les protéines de la membrane externes (OMP) et la résistance à l'effet bactériolytique du sérum</i> .....	42
4.2	<i>Les peptides cationiques antimicrobiens (CAMP)</i> .....	42
4.2.1	<i>Où retrouve-t-on les CAMP?</i> .....	42

4.2.2	<i>Propriétés des CAMP : structure et composition</i> .....	43
4.2.3	<i>Mécanismes d'action et effets sur l'hôte et sur le pathogène</i> .....	43
4.2.4	<i>Les LPS et la résistance aux CAMP</i> .....	44
4.2.4.1	<i>Modifications covalentes de la structure prototype du lipide A</i> .....	45
4.2.4.2	<i>Régulation des modifications covalentes du lipide A</i> .....	46
4.2.5	<i>Les CAMP utilisés dans cette étude</i> .....	48
4.3	<i>Acidité</i> .....	48
4.3.1	<i>Environnement à pH acide</i> .....	48
4.3.2	<i>Les mécanismes de défense contre le stress acide</i> .....	49
4.3.3	<i>Les systèmes de ménage dans le maintien du pH interne</i> ....	50
4.3.4	<i>La résistance et la tolérance à l'acidité</i> .....	52
4.3.4.1	<i>La phase stationnaire de croissance et l'acidité</i> .....	52
4.3.4.2	<i>La porine PhoE et l'acidité</i> .....	53
4.3.5	<i>Les acide gras cyclopropanes (CFA) et l'acidité</i> .....	53
4.3.6	<i>Le potentiel membranaire (<math>\Delta\psi</math>)</i> .....	55
4.3.7	<i>Le système de résistance à l'acidité dépendant des glutamates décarboxylases</i> .....	56
4.3.8	<i>Le gène Pho-dépendant asr et son rôle dans la réponse au stress acide</i> .....	57
5.	<i>Les souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales : les ExPEC</i> .....	59
5.1	<i>Les facteurs de virulence associés aux ExPEC</i> .....	60
5.2	<i>Les souches ExPEC aviaires ou APEC (« Avian Pathogenic E. coli »)</i> .....	60
5.2.1	<i>Étiologie des APEC</i> .....	60
5.2.2	<i>L'infection aux APEC</i> .....	61
5.2.3	<i>La souche APEC <math>\chi</math>7122</i> .....	62
5.3	<i>La souche ExPEC porcine non-entérotoxigène 5131 de sérogroupe O115</i> .....	64



5.4	La capsule des souches ExPEC 5131 et $\chi$ 7122.....	65
6.	Le projet de recherche.....	66
6.1	Problématique et contexte scientifique.....	66
6.2	Hypothèse de travail.....	67
6.3	Objectifs de travail.....	68
6.4	Esquisse de l'étude.....	68
<b>MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....</b>		<b>70</b>
<b>Article 1 : Inactivation of the Pst System Reduces the Virulence of an Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> O78 strain.....</b>		
		<b>71</b>
<b>Article 2 : Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under <i>Escherichia coli</i> phosphate (Pho) regulon activation.....</b>		
		<b>111</b>
<b>Article 3 : Growth Phase-dependent Membrane Perturbations Occur in an <i>Escherichia coli</i> Phosphate Specific Transport (Pst) Mutant Strain.....</b>		
		<b>148</b>
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>		<b>165</b>
1.	L'état d'activation continue du TCS PhoR/PhoB chez les mutants <i>pst</i> .....	167
2.	Modèles d'infections expérimentales.....	167
2.1	Les mutants <i>pst</i> isogéniques des souches ExPEC 5131 et $\chi$ 7122 sont fortement atténués pour la virulence dans des modèles expérimentaux d'infection porcine et aviaire.....	167
2.2	Autres études associant Pst à la virulence de pathogènes extra-intestinaux.....	168

2.3	Autres études associant Pst à la virulence de pathogènes intestinaux.....	169
2.4	Autres études qui démontrent l'importance du TCS PhoR/PhoB pour la virulence bactérienne.....	170
3.	La surface bactérienne et le régulon Pho.....	170
3.1	Tests de résistance au sérum et aux peptides cationiques antimicrobiens (CAMP).....	170
3.1.1	<i>Les mutants pst sont sensibles à l'effet bactéricide du sérum.....</i>	170
3.1.2	<i>Les mutants pst sont sensibles aux peptides cationiques antimicrobiens (CAMP) polymyxine B (PMB) et cécropine PI (CPI).....</i>	172
3.1.3	<i>La complémentation des mutants pst.....</i>	172
3.2	Quels facteurs peuvent expliquer ces phénotypes de sensibilité?.....	172
3.2.1	<i>Modifications Pho-dépendantes de structures de la surface bactérienne.....</i>	173
3.3	Analyse des LPS et CPS.....	174
3.3.1	<i>Les analyses SDS/Tricine-PAGE et Western blot n'ont pas révélé de différences dans les profils LPS des souches.....</i>	174
3.3.2	<i>Le matériel capsulaire des souches ExPEC 5131 et <math>\chi</math>7122.....</i>	175
3.3.3	<i>Les groupements à charge négative situés dans le noyau des LPS sont importants pour la stabilité et l'intégrité membranaire.....</i>	176
3.3.4	<i>Analyses du lipide A en milieu riche en phosphate.....</i>	176
3.3.5	<i>Analyses du lipide A et de la résistance à la polymyxine en milieu à faible teneur en phosphate.....</i>	178
3.3.6	<i>L'état d'activation du TCS PhoR/PhoB influence la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate et la résistance à la polymyxine.....</i>	178

3.3.7	<i>Les modifications covalentes du lipide A chez la souche K3.....</i>	179
3.4	<i>Le régulon Pho et le stress acide.....</i>	180
3.4.1	<i>Les mutants pst sont sensibles au choc acide.....</i>	180
3.4.2	<i>Comment Pst peut influencer la résistance à l'acidité.....</i>	181
3.4.2.1	<i>Régulation de gènes de résistance à l'acidité.....</i>	181
3.4.2.2	<i>Rôle de la porine PhoE dans le phénotype de sensibilité au choc acide chez les mutants pst.....</i>	182
3.5	<i>Membrane et perméabilité.....</i>	182
3.5.1	<i>Évaluation de la perméabilité membranaire.....</i>	182
3.5.1.1	<i>Le mutant pst K2 a une perméabilité membranaire accrue en début de phase stationnaire de croissance.....</i>	183
3.5.2	<i>Les lipides membranaires.....</i>	184
3.5.2.1	<i>Le système Pst influence la composition en acides gras membranaires.....</i>	184
3.5.2.2	<i>Pst influence les CFA.....</i>	185
3.5.3	<i>Intégration sur la section 3.5.....</i>	185
3.5.3.1	<i>La réponse stringente.....</i>	186
3.6	<i>Les mutants pst sont sensibles à la vancomycine.....</i>	189
3.7	<i>Étude de transcriptomique comparative par puce à ADN entre la souche APEC <math>\chi</math>7122 et K3.....</i>	189
3.7.1	<i>Analyses des gènes de la biosynthèse des LPS par puce à ADN.....</i>	189
3.7.2	<i>Les gènes ayant un rôle potentiel dans la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate.....</i>	191
3.7.2.1	<i>YeiU, le facteur responsable de la biosynthèse du lipide A 1- pyrophosphate.....</i>	191
3.7.3	<i>Les variants du lipide A.....</i>	192
3.7.4	<i>Analyse des gènes des voies de biosynthèse des acides gras.....</i>	193
4.	<i>Les biofilms et le régulon Pho.....</i>	194

**CONCLUSIONS.....196**  
**BIBLIOGRAPHIE.....203**  
**ANNEXES.....i**

**Article 4 : The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network  
connecting phosphate homeostasis and pathogenesis.....ii**

## LISTE DES TABLEAUX

### RECENSION DE LA LITTÉRATURE

**Tableau I.** Gènes appartenant au régulon Pho d'*Escherichia coli* .....10

**Tableau II.** Gènes de virulence de 5131 et  $\chi$ 7122 identifiés par puce à ADN.....63

### MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

#### ARTICLE 1

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids used for this study.....103

**Table 2.** Score-based evaluation of colibacillosis lesions.....104

#### ARTICLE 2

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids.....140

**Table 2.** LPS-related genes identified by microarray experiments using Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array.....141

#### ARTICLE 3

**Table 1.**  $\beta$ -Lactamase activities and nitrocefin permeation through the outer membrane of the 5131 ExPEC strain and its isogenic *pst* mutant.....162

**Table 2.** Fatty acid profiles<sup>a</sup> of the mutant strains compared to the wild type 5131 strain obtained by gas chromatography in high (LB) or low phosphate (LP) media.....163

### ANNEXES

#### ARTICLE 4

**Table 1.** Identification of *in vivo* expressed PhoB-dependent genes using infection models.....xxxviii

## LISTE DES FIGURES

### RECENSION DE LA LITTÉRATURE

<b>Figure 1.</b> Structure génétique du transcrit de l'opéron <i>pst</i> .....	14
<b>Figure 2.</b> Contrôle du régulon Pho et signaux de transduction transmembranaire induits par le phosphate inorganique (P <sub>i</sub> ).....	16
<b>Figure 3.</b> Images de microscopie confocale obtenues de différents clones de la collection ASKA (« A complete Set of <i>E.coli</i> K-12 ORF Archive).....	24
<b>Figure 4.</b> Activation de PhoB par des histidines kinases (HK) non analogues.....	28
<b>Figure 5.</b> Structure de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram-négatif.....	32
<b>Figure 6.</b> Structure du Kdo <sub>2</sub> -lipide A chez <i>E. coli</i> K-12 et <i>Salmonella</i> ....	35
<b>Figure 7.</b> Activation du système du complément .....	40

### MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

#### ARTICLE 1

<b>Figure 1.</b> Transcriptional analysis of the <i>pst</i> operon and Pho regulon in <i>E. coli</i> strain $\chi$ 7122 and its mutants.....	105
<b>Figure 2.</b> Experimental infection of chickens with APEC strain $\chi$ 7122 or derivatives via the air sacs.....	106
<b>Figure 3.</b> Bacterial resistance to serum.....	107
<b>Figure 4.</b> Polymyxin assay.....	108
<b>Figure 5.</b> Analysis of LPS by Tricine SDS-PAGE (A) and SDS-PAGE (B).....	109
<b>Figure 6.</b> Acid shock resistance experiment.....	110

**ARTICLE 2**

<b>Figure 1.</b> <i>E. coli</i> lipid A structure.....	142
<b>Figure 2.</b> Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) assay.....	143
<b>Figure 3.</b> Vancomycin assay.....	144
<b>Figure 4.</b> Lipopolysaccharide (LPS) analysis.....	145
<b>Figure 5.</b> Analysis of radiolabeled lipid A by thin layer chromatography (TLC) of strains grown in high phosphate (LB) medium.....	146
<b>Figure 6.</b> MALDI-TOF analyses of lipid A from the wild-type (A) and the <i>pst</i> mutant K3 (B) grown in LP medium.....	147

**ARTICLE 3**

<b>Figure 1.</b> Acid shock resistance experiment.....	164
--	-----

**ANNEXES****ARTICLE 4**

<b>Figure 1.</b> Control of the Pho regulon and transmembrane signal transduction by environmental inorganic phosphate (P <sub>i</sub> ).....	xxxix
<b>Figure 2.</b> Scheme illustrating interactions between the Pho regulon, Poly P biosynthesis pathway, RpoS, and the stringent response major factors.....	xl

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\chi$	chi
$\Delta$	delta
$\gamma$	gamma
$\kappa$	kappa
$\lambda$	lambda
$\mu$	micro
$\sigma$	sigma
$\omega$	omega
$\psi$	phi
$\Delta\psi$	potentiel membranaire
%	pourcentage
ABC	(ATP binding cassette)
ACP	(acyl-carrier protein)
ADN ou DNA	acide désoxyribonucléique (desoxyribonucleic acid)
ADP	adénosine diphosphate
$Al^{3+}$	aluminium
Amp	ampicilline
ANOVA	analyse de variance (analysis of variance)
AP	phosphatase alcaline (alkaline phosphatase)
APEC	<i>E. coli</i> pathogène aviaire (avian pathogenic <i>E. coli</i> )
AR	résistance à l'acide (acid resistance)
ARN ou RNA	acide ribonucléique (ribonucleic acid)
ARNm	ARN messenger
ASKA	A complete Set of <i>E. coli</i> K-12 ORF Archive
Asr	(acid shock RNA)
ATP	adénosine triphosphate
ATR	tolérance à l'acide (acid tolerance)
BMEC	cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (brain microvascular endothelial cells)
C	carbone
°C	degré Celsius
$Ca^{2+}$	calcium



CAMP	peptide cationique antimicrobien (cationic antimicrobial peptide)
Cdh	CDP-diglyceride pyrophosphatase
c-di-GMP	GMP dimérique cyclique
CDP	cytidine diphosphate
CFA	acide gras cyclopropane (cyclopropane fatty acid)
CFU	unité formatrice de colonie (colony forming unit)
CK2	mutant <i>pst</i> porcine complémenté
CK3	mutant <i>pst</i> aviaire complémenté
Cl <sup>-</sup>	chlore
Cm	chloramphénicol
CMH-I	complexe majeur d'histocompatibilité de type I
Co <sup>2+</sup>	cobalt
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CP1	cécropine P1
CPS	capsule polysaccharidique
Cre	régulateur catabolique
Ct	cycle seuil (threshold cycle)
C-terminal	carboxy-terminal
D-ala	D-alanine
Da	dalton
DBTD	domaine bi-fonctionnel de liaison à l'ADN et de transactivation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECA	antigène commun des Entérobacteriaceae (Enterobacteriaceae common antigen)
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique (enterohemorrhagic <i>E. coli</i> )
ELISA	(enzyme-linked immunosorbent assay)
EPEC	<i>E. coli</i> entéropathogène (enteropathogenic <i>E. coli</i> )
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxigène (enterotoxigenic <i>E. coli</i> )
ExPEC	<i>E. coli</i> pathogène causant des maladies extra-intestinales (extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> )
FA	acide gras (fatty acid)
FACS	(fluorescence activated cells sorting)
Fe <sup>3+</sup>	fer
FV	facteur de virulence
G3P	<i>sn</i> -glycerol-3-phosphate

G6P	glucose-6-phosphate
GABA	acide $\gamma$ -amino butyrique
Gad	glutamate décarboxylase
GC	chromatographie en phase gazeuse (gas chromatography)
GMP	guanosine monophosphate
GFP	(green fluorescence protein)
GREMIP	groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc
H <sup>+</sup>	hydrogène
HK	histidine kinase
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	ion dihydrogéoorthophosphate
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ion hydrogéoorthophosphate
IL	interleukine
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
K <sup>+</sup>	potassium
K2	mutant <i>pst</i> porcin
K3	mutant <i>pst</i> aviaire
K <sub>d</sub>	constante de dissociation
K <sub>LPS</sub>	capsule polysaccharidique de type « O-like »
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis
Kan	kanamycine
kDa	kilodalton
KDO	acide 3-keto-deoxy-D-manno-octulosomique
L	litre
L-Ara4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinose
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
LBP	(LPS-binding protein)
LCFA	acide gras à longue chaîne (long chain fatty acid)
LEE	Lee (locus of enterocytes effacement)
log	logarithme
LP	milieu de culture de faible concentration en phosphate (low-phosphate)
LPS	lipopolysaccharide
M	molaire
M2	mutant <i>pst</i> Tn <i>phoA</i>
MAC	complexe d'attaque membranaire (membrane attack complex)
MALDI-TOF	(matrix assisted laser desorption ionization time of flight)

MAP	(mitogen activated protein)
MASPs	(MBL-associated serine protease)
MBL	(mannose binding lectin)
ME ou OM	membrane externe (outer-membrane)
MeHPO <sub>4</sub>	complexe métal-phosphate
Mg <sup>2+</sup>	magnésium
mg	milligramme
MI ou IM	membrane interne (inner-membrane)
MIC	concentration minimale inhibitrice (minimal inhibitory concentration)
min	minute
MKK	MAP kinase kinase
ml	millilitre
Mn <sup>2+</sup>	manganèse
mol	mole
MRHA	(mannose resistant hemaglutinine)
mV	millivolt
<i>m/z</i>	masse / charge
NA	acide nalidixique (nalidixic acid)
NF-κβ	facteur nucléaire κβ (nuclear factor κβ)
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	métavanadate
nm	nanomètre
nmol	nanomole
N-terminal	amino-terminal
OD	densité optique (optic density)
OMP	protéine de la membrane externe (outer-membrane protein)
ORF	(open reading frame)
Pag	(PhoQ/PhoP activated genes)
PAI	(pathogenicity island)
pAPEC-1	plasmide de virulence de la souche APEC χ7122
Pb	paires de bases
PBS	(phosphate buffered saline)
pEtN	phosphoéthanolamine
Pho	phosphate
PhoB-P	PhoB phosphorylée
P <sub>i</sub>	phosphate inorganique

Pit	Transporteur du P <sub>i</sub> (P <sub>i</sub> transporter)
PMB	polymyxine B
PolyP <sub>i</sub>	métaphosphate
ppGpp	guanosine tétraphosphate
PP <sub>i</sub>	pyrophosphate
pppGpp	Guanosine pentaphosphate
Ppx	PolyP <sub>i</sub> phosphatase
Prg	(PhoQ/PhoP repressed genes)
Pst	Système de transport spécifique du phosphate (phosphate specific transport system)
QS	senseur de quorum (quorum sensing)
RD	domaine receveur
REP	structure palindromique (repetitive extragenic palindromic)
RpoS	facteur sigma alternatif (sigmaS)
RR	régulateur de réponse
RT-PCR	transcription réverse-réaction en chaîne polymérase (reverse transcription-polymerase chain reaction)
SCOTS	capture sélective des séquences transcrites
SDS	(sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
Sm	streptomycine
T3SS	système de sécrétion de type III
TCS	système à deux composantes (two component regulatory system)
TLC	chromatography en couche mince (thin layer chromatography)
TLR	(toll-like receptor)
TNF- $\alpha$	(tumor necrosis factor $\alpha$ )
UFA	acide gras insaturé (unsaturated fatty acid)
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogène (uropathogenic <i>E. coli</i> )
UTI	infection du tractus urinaire (urinary tract infection)
UTR	séquence non-traduite (untranslated sequence)
V <sub>max</sub>	Vitesse enzymatique maximale
XP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
Zn <sup>2+</sup>	zinc

*Aux décrocheurs et aux jeunes qui se cherchent ....  
...pour un peu d'espoir*

## REMERCIEMENTS

Merci à Dre Josée Harel, pour m'avoir dirigé avec intérêt, rigueur, pertinence et inspiration, à travers la jungle de ce projet de doctorat.

Merci aux membres du laboratoire Harel, présents et passés, pour leur aide et conseils, mais aussi pour les bons moments passés...

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

Un merci particulier à mon co-directeur Daniel Dubreuil et à Michaël Mourez pour les nombreux échanges parfois colorés, mais toujours productifs!

Merci à mes collaborateurs : Russell E. Bishop et Turlough Finan (McMaster University), Sang-Hyun Kim (The National Primate Research Center, République de Corée), Roy Curtiss III (Arizona State University), Charles Dozois et François Lépine (INRS-Institut Armand-Frappier), Carl Uhland (FMV) et Barry L. Wanner (Purdue University).

Merci aux Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), à la Faculté des Études Supérieures (FÉS) de l'Université de Montréal, à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal (FMV) et au Centre en infectiologie porcine (CRIP) pour le financement.

V, ton existence m'enchante

# **AVANT-PROPOS**

Depuis longtemps, les scientifiques s'intéressent à *Escherichia coli* comme système biologique modèle, autant pour l'étude des voies métaboliques, des voies de biosynthèses, de la régulation génétique, des cascades signalétiques, que pour la production de molécules hétérologues. Au niveau de plusieurs aspects, cette bactérie est l'une des mieux caractérisées. Malgré cela, beaucoup reste encore à découvrir.

*E. coli* est un coccobacille Gram-négatif anaérobie facultatif. Cette bactérie occupe naturellement plusieurs niches écologiques de l'environnement ainsi que plusieurs hôtes. En effet, *E. coli* fait partie du biote indigène intestinal de plusieurs mammifères. Cependant, les phénomènes de mutations et de transfert horizontaux engendrant des modifications génomiques et plasmidiques ont généré de nombreux variants génétiques augmentant le *fitness* de ces derniers pour leur niche écologique respective, ainsi que pour de nouvelles niches. Ces événements génétiques sont à la base de l'acquisition de facteurs de virulence (FV) et sont responsables de la capacité des pathogènes à causer la maladie. Il est certain qu'une souche ayant plusieurs FV a plus de chances d'acquérir un bagage plus important de FV de façon subséquente de par les pressions de sélection dans l'hôte et de par la co-habitation avec d'autres pathogènes.

Certes, l'avènement du séquençage automatisé et de l'obtention de séquences de génomes entiers a permis un progrès considérable au niveau de la compréhension de l'organisation du génome et du développement de la recherche fonctionnelle *in silico*. Déjà, la protéomique remplace la génomique, fruit du désir d'associer des structures et fonctions aux séquences pour l'instant « muettes ». La tâche est cependant beaucoup plus



ardue qu'il n'y paraît. La recherche fondamentale en microbiologie cellulaire est nécessaire et est la clé menant aux nombreuses découvertes à venir. Dans une cellule bactérienne et même à l'extérieur, les molécules communiquent, résultant en une multitude d'événements « action-réaction » permettant à la cellule de vivre, de se diviser, d'occuper une niche écologique donnée, de survivre à des stress environnementaux et parfois même, à provoquer sa destruction pour permettre la survie de sa population. La base moléculaire de la régulation implique des interactions complexes entre plusieurs signaux et composantes cellulaires, dont les molécules d'acides désoxyribonucléiques (ADN) elles-mêmes, avec leurs séquences d'acides nucléiques spécifiques, leurs protéines associées et leurs topologies. La présence et la fonctionnalité d'une protéine dépendent de plusieurs facteurs. La régulation au niveau de la transcription, des acides ribonucléiques (ARN) et de la traduction (*post* événement aussi) est en effet responsable des phénotypes « mesurables et observables » dans une cellule. De plus, les voies métaboliques et de régulations ne sont pas nécessairement exclusives et isolées dans l'espace et le temps. En effet, les multiples voies métaboliques et signalétiques peuvent être redondantes, s'entrecroiser et s'influencer mutuellement. Ainsi, le réseau des événements de régulation, permettant l'homéostasie cellulaire, est extrêmement complexe et nécessite, entre les différentes parties, une bonne communication.

# **INTRODUCTION**

Chez les microorganismes, la capacité à répondre aux différents stimuli rencontrés dans l'environnement est déterminante pour leur survie. Celle-ci nécessite des mécanismes globaux de régulation impliquant des systèmes pouvant contrôler plusieurs éléments génétiques de façon coordonnée. Par exemple, le système à deux composantes (TCS) PhoR/PhoB répond aux concentrations extra-cytoplasmique en phosphate inorganique ( $P_i$ ), en activant ou en réprimant plusieurs gènes à la fois. Ces gènes appartiennent conceptuellement au régulon Pho et sont importants pour le maintien de l'homéostasie cellulaire en situation de carence environnementale en phosphate. Le système Pst qui appartient au régulon Pho est impliqué dans l'acquisition spécifique du phosphate dans ces conditions. Il joue aussi un rôle dans le contrôle du TCS PhoR/PhoB. Une mutation dans le système Pst résulte en l'activation continue du régulon Pho. Cette thèse de doctorat traite du rôle du régulon Pho dans la virulence chez des souches d'*E. coli* pathogènes qui causent des maladies extra-intestinales (les ExPEC) et particulièrement des structures de la surface bactérienne affectées par une mutation dans Pst et qui peuvent être associées à des traits de virulence.

Dans la prochaine section, une recension détaillée des connaissances actuelles sur le régulon Pho et le système Pst est d'abord présentée. Dans un deuxième temps, la composition de la surface des bactéries à Gram-négatif est décrite de même que le rôle de certaines de ses structures dans la résistance à des stress pouvant être rencontrés chez l'hôte. Dans cette optique, les mécanismes de résistance à l'effet bactéricide du sérum, aux peptides

cationiques antimicrobiens et au choc acide sont présentés comme modèles. Ceux-ci sont associés à la capacité des ExPEC à causer la maladie. La dernière partie de cette première section est consacrée à la description des souches ExPEC utilisées dans cette étude ainsi qu'à l'énoncé de la problématique contextuelle, de l'hypothèse et des objectifs visés par le présent travail. Comme il sera discuté, l'activation du régulon Pho a un effet global sur la cellule bactérienne permettant à celle-ci non seulement de s'adapter et de survivre dans un environnement pauvre en phosphate, mais aussi de répondre adéquatement à différents stress et d'exprimer des caractéristiques associées à la virulence.

**RECENSION DE LA  
LITTÉRATURE**

## **1. Comment les bactéries perçoivent les stimuli environnementaux**

Il existe trois mécanismes par lesquels les bactéries perçoivent et répondent aux changements environnementaux : les mécanismes de senseur de quorum (QS; « quorum sensing »), les systèmes à une composante et ceux à deux composantes. Le QS est un mécanisme de régulation permettant la synchronisation de l'expression de certains gènes au niveau d'une population bactérienne (277). Le QS est un processus de communication de cellule à cellule qui est tributaire de la densité d'une population bactérienne. Les bactéries relâchent dans l'environnement de petites molécules « signales » qui, à forte concentration, induisent une réponse coordonnée au sein de la population bactérienne. Certaines de ces molécules signales diffusent directement à travers les membranes et s'associent à des régulateurs génétiques. D'autres sont des ligands de récepteurs situés à la surface cellulaire et induisent des cascades signalétiques de même nature que celles induites par les systèmes à une ou à deux composantes. Les systèmes à une composante sont des sérine/thréonine kinases ou tyrosine kinases similaires à celles retrouvées chez les eucaryotes (46, 86). Ces systèmes de signalisation cellulaire dépendent de transferts d'un groupement phosphoryle entre différentes protéines. Comme il sera expliqué dans les prochaines sections, les systèmes à deux composantes (TCS) fonctionnent de façon similaire. Les TCS sont cependant beaucoup mieux caractérisés et leur rôle dans la réponse des bactéries à l'environnement est appréciable.

### 1.1 Les systèmes à deux composantes (TCS)

Les systèmes à deux composantes (TCS) sont généralement composés de deux protéines d'où leur nom (Voir aussi section 2.3.3 p.15). Une première protéine, apte à capter un ou des signaux environnementaux, phosphoryle une seconde protéine qui, sous forme phosphorylée, joue le rôle d'activateur ou de répresseur transcriptionnel (104, 105, 237, 282). Les TCS sont impliqués dans plusieurs processus de réponses cellulaires comme la motilité, la résistance aux antimicrobiens, l'osmorégulation, la sporulation, la fixation de l'azote, l'invasion de cellules hôtes, l'acquisition du phosphate, etc (22, 26). Chez *E. coli*, une trentaine de TCS ont, à ce jour, été décrits (263). Les TCS sont absents chez les humains (26), faisant de ces systèmes des cibles intéressantes pour des molécules antimicrobiennes.

## 2. Le phosphate et la vie

Le carbone, l'azote et le phosphate sont les trois éléments les plus abondants sur Terre. Ce sont des éléments essentiels à la vie. Nous traiterons ici du phosphate, thème unificateur du présent travail. Le phosphate fait partie intégrante de la structure de plusieurs composantes cellulaires comme les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Le phosphate est présent dans de nombreuses voies métaboliques. Par exemple, le phosphate inorganique ( $P_i$ ) est utilisé comme substrat par les enzymes de la glycolyse, du cycle des acides tricarboxyliques et de la fermentation. Aussi, le  $P_i$  est très important dans le métabolisme énergétique cellulaire puisque cette molécule crée des liens

phospho-anhydrides hautement énergétiques. De plus, les voies signalétiques intracellulaires dépendent, entre autres, de phospho-relais impliquant la transmission de groupements phosphoryles entre protéines. Ainsi, en plus d'un rôle structural, le phosphate est impliqué dans les mécanismes moléculaires fondamentaux permettant la vie elle-même. Chez *E. coli*, la gestion du phosphate est prise en charge, en partie, par le régulon Pho. Ce dernier appartient conceptuellement au stimulon phosphate, soit tous les gènes affectés par les variations environnementales en phosphate (262). Le régulon Pho est induit en situation de carence en phosphate (271).

## 2.1 *Escherichia coli* et le phosphate

*E. coli* utilise trois composés comme source primaire de phosphate : le  $P_i$ , l'organophosphate (les esters de phosphate) et les phosphonates. Les phosphonates font partie d'une grande catégorie d'organophosphates ayant comme caractéristique particulière d'avoir un lien direct carbone-phosphate à la place d'un lien carbone-oxygène-phosphate normalement retrouvé chez les organophosphates. On retrouve trois formes chimiques de phosphate inorganique dans une cellule d'*E. coli*: le  $P_i$ , le pyrophosphate ( $PP_i$ ) et le métaphosphate ( $polyP_i$ ) (262). Les concentrations intracellulaires en  $P_i$  et en  $PP_i$  sont de façon générale invariables. Celles-ci sont de 10 mM pour le  $P_i$  et de 0,5 mM pour le  $PP_i$ . La concentration en  $polyP_i$  peut varier de 0,1 à 50 mM (126). Cependant, chez *E. coli*, les réserves de  $polyP_i$  varient moins que chez d'autres bactéries et se situent autour de 0,2 mM. Chez *E. coli*, le  $PP_i$  cytosolique est dégradé en  $P_i$  par une pyrophosphatase unique codée par le gène *ppa* qui est



essentielle à la survie de la bactérie. Le polyP<sub>i</sub> est synthétisé par la cellule principalement en situation de stress environnementaux comme des carences en P<sub>i</sub>, en azote, en acides aminés et de fortes concentrations en sels. Le PolyP<sub>i</sub> est une molécule hautement énergétique puisqu'elle est constituée de multiples liaisons phospho-anhydres. Le polyP<sub>i</sub> peut jouer le rôle de substituant de l'adénosine triphosphate (ATP) dans les réactions kinases, de réservoir de P<sub>i</sub>, d'agent chélateur de métaux, de tampon contre les stress alcalins, etc (126). Le gène *ppk* est le premier de deux gènes organisés en opéron. Ppk est une enzyme capable de synthétiser le polyP<sub>i</sub> à partir de l'ATP et *vice versa*. Le second gène, *ppx*, code pour une exopolyphosphatase. L'hydrolyse par Ppx est faite à partir des terminaisons des chaînes de polyP<sub>i</sub>, produisant du P<sub>i</sub>. La dégradation du polyP<sub>i</sub> par Ppx en situation de carence en phosphate peut résulter en la répression du régulon Pho puisque le P<sub>i</sub> relâché peut se retrouver dans le périplasme, ce qui régule à la baisse l'activité de Pho (261) (Voir section 2.3, p. 9).

## 2.2 Le stimulon phosphate

VanBogelen et ses collaborateurs (1996) ont démontré que la variation des concentrations en phosphate influence grandement le profil du protéome d'une souche d'*E. coli* K12 (262). En effet, il a été vu, par analyses en gel 2-dimensions, qu'une carence en phosphate induit 208 protéines et réprime le niveau d'expression de 205 protéines. Sur la base que le chromosome de *E. coli* contient grossièrement 4000 gènes codant pour des protéines, le stimulon phosphate représente donc environ 10% des gènes. Cependant, plusieurs de ces

protéines sont influencées par d'autres conditions environnementales. Ainsi, plusieurs protéines observées par gel 2-dimensions ne sont pas exclusives au stimulum phosphate, mais sont sous le contrôle de plusieurs systèmes de régulation à la fois, comme dans la programmation de l'entrée en phase stationnaire de croissance. Il est donc attendu que plusieurs de ces protéines fassent aussi partie d'autres stimulons (262).

## 2.3 Le régulon Pho

### 2.3.1 Généralités sur le régulon Pho

Le régulon Pho a pour fonction l'acquisition et l'utilisation de différentes sources de phosphate en condition de carence en phosphate. Par définition, tous les gènes d'un régulon sont soumis à un même contrôle moléculaire. Les gènes du régulon Pho d'*E. coli* sont sous le contrôle du TCS PhoR/PhoB. L'opéron *phoBR* code pour ce TCS et est soumis à une régulation autogène (272). Les gènes du régulon Pho sont organisés en mono et polycistrons. De façon générale, les produits protéiques de ces gènes sont impliqués dans l'acquisition et l'utilisation du phosphate incluant la dégradation et la synthèse de molécules phosphatées. À ce jour, chez *E. coli*, 47 gènes peuvent être considérés comme faisant partie de ce régulon (Tableau I) (11, 94, 100, 226, 242, 272). De plus, les recherches récentes sur le régulon Pho ont mis en évidence des gènes Pho-dépendants dont les fonctions se distinguent du rôle habituel des gènes appartenant à ce régulon (Tableau I). L'expression du

Tableau I : Gènes appartenant au régulon Pho d'*Escherichia coli* <sup>a</sup>

Mono et polycistrons	Fonctions
<i>phoBR</i>	Système à deux composantes contrôlant l'expression des gènes du régulon Pho
<i>pstSCAB-phoU</i>	Co-régulateur du régulon Pho ; système de transport spécifique pour le phosphate inorganique (P <sub>i</sub> )
<i>ugpBAECQ</i>	Système de transport du glycérol-3-phosphate et de son hydrolyse comme source de P <sub>i</sub>
<i>phnCDEFGHIJKLMNOP</i>	Système de transport des phosphonates et de leurs dégradation : voie C-P lyase
<i>phoApsiF</i>	Le gène <i>phoA</i> code pour une phosphomonoestérase alcaline non spécifique alors que <i>psiF</i> code pour une protéine périplasmique de fonction inconnue
<i>phoE</i>	Porine ayant une légère préférence pour les anions
<i>phoH</i>	Protéine liant l'ATP de fonction inconnue
<i>psiE</i>	Protéine hydrophobe de fonction inconnue
<i>pitB*</i>	Système de transport du P <sub>i</sub>
<i>yibD</i>	Glycosyl transférase ou inosine triphosphate diphosphatase ou ribulose-bisphosphate carboxylase hypothétique. Le gène <i>yibD</i> est aussi régulé par BasR/BasS en réponse aux variations de concentration en fer et zinc. Pourrait avoir un rôle à jouer dans la résistance aux détergents
<i>amn</i>	AMP nucléosidase
<i>ytfK</i>	Protéine de fonction inconnue
<i>iciA</i>	IciA est un régulateur de la famille LysR, contrôlant les gènes impliqués dans le transport de l'arginine. IciA inhibe l'initiation de la réplication de par sa liaison à OriC
<i>asr</i>	Protéine de type chaperonne impliquée dans la tolérance au stress acide
<i>oppABCDF*</i>	Transporteur de type ABC impliqué dans le transport d'oligopeptides et dans le recyclage des peptides de la paroi cellulaire
<i>dppABCDF*</i>	Transporteur de type ABC impliqué dans le transport de dipeptides. Similaire au système Opp

\* Gènes réprimés par l'activation du régulon Pho

<sup>a</sup>Références : 11, 94, 100, 226, 242, 272

régulon Pho est inhibée lorsque sa source préférentielle de phosphate, soit le  $P_i$ , est en concentration environnementale (périplasmique) non limitante. La croissance en milieu pauvre en  $P_i$  résulte en un accroissement de cent fois l'expression des gènes du régulon Pho (235). La concentration seuil de  $P_i$  causant l'activation ou la répression du régulon Pho est de 4  $\mu$ M. Il existe une transition très mince entre l'état activé et inactivé du régulon Pho (260). En situation de carence en phosphate, l'acquisition du  $P_i$  périplasmique se fait par le système de transport spécifique (Pst) appartenant aussi au régulon Pho. Aucun gène appartenant au régulon Pho ne semble être sujet à une régulation individuelle étant donné qu'aucun gène requis pour l'utilisation d'une source spécifique de phosphate n'est régulé en réponse à la présence de ce même composé. Dans l'hôte, les concentrations en phosphate sont généralement non inductrices pour le régulon Pho. Par exemple, chez le porcelet naissant, les concentrations plasmatiques de phosphate sont de 1,5 mmol/L alors qu'après deux semaines, elles grimpent à 3,0 mmol/L (280). Cependant, comme il est montré dans la présente étude, le régulon Pho peut parfois être activé dans ces conditions. Ainsi, le régulon Pho pourrait être induit par d'autres conditions environnementales. Il est aussi vraisemblable que, lors d'une infection, les bactéries rencontrent des micro-environnements dans lesquels la concentration en phosphate est limitante.

#### 2.3.1.1 *Organophosphates et phosphonates*

Les systèmes permettant l'acquisition des organophosphates chez *E. coli* sont: Ugp, GlpT, UhpT et Phn (272). Les gènes responsables de la saisie et

de la transformation des phosphonates, soit les gènes de l'opéron *phn*, appartiennent au régulon Pho. Le système Ugp, aussi sous le contrôle du régulon Pho, permet l'acquisition d'un organophosphate, soit le *sn*-glycérol-3-phosphate (G3P), comme source de phosphate (220, 272).

### 2.3.1.2 *La phosphatase alcaline PhoA et la porine PhoE*

PhoA est une phosphomonoestérase alcaline non-spécifique qui appartient au régulon Pho. PhoA est une protéine périplasmique. Son expression peut être augmentée de mille fois en condition de carence en phosphate (272). PhoA est une phosphatase très importante pour la cellule puisqu'elle rend disponible le  $P_i$  dont la cellule a besoin pour survivre dans des environnements où le phosphate est rare. Son activité est aussi utilisée comme mesure de l'état d'activation du régulon Pho. Pour sa part, la porine PhoE est composée d'un trimère d'une protéine de 330 acides aminés. L'association en trimère s'effectue lors de l'insertion dans la membrane externe (ME). Chaque monomère forme un canal constitué de 16 feuillettes  $\beta$ -antiparallèles (272). En situation de carence en phosphate, PhoE est produite en grande quantité et permet l'entrée dans le périplasma, par diffusion passive, de plusieurs petites (jusqu'à 600 Da) molécules hydrophiles comme les organophosphates et le  $P_i$  (67, 68).

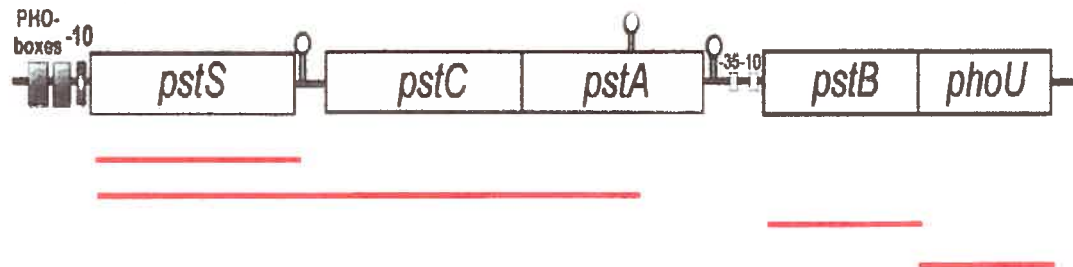
## 2.3.2 *Le système de transport spécifique du phosphate (Pst)*

### 2.3.2.1 *Les gènes *pstSCAB-phoU**

Les gènes codant pour le système Pst, soit l'opéron *pstSCAB-phoU*, sont situés à 84 min sur le chromosome. Il a été démontré que cet opéron génère un seul transcrit polycistronique, clivé de façon sites spécifiques en différents ARNm, certains d'entre eux ayant une demi-vie plus courte que d'autres (Figure 1) (1). L'ARNm correspondant à *pstS* est le transcrit principal de l'opéron. Une structure palindromique (REP) (« Repetitive Extragenic Palindromic »), située immédiatement en 3' du transcrit, permettrait la stabilisation de celui-ci, puisqu'elle inhibe la dégradation 3'-5' exonucléolytique (Figure 1) (1, 4, 241).

### 2.3.2.2 Le transporteur PstSCAB

Chez *E. coli* et plusieurs autres bactéries à Gram-négatif, le système Pst permet le transport unidirectionnel du  $P_i$  du périplasme vers le cytosol (Figure 2). Ce système à haute affinité pour le  $P_i$  le transporte à faible vélocité ( $K_m = 0,4 \mu\text{M}$ ;  $V_{max} 15,9 \text{ nmol de } P_i/\text{min/mg de protéines}$ ) (260, 272). Les protéines PstSCAB forment un système de transport ABC (« ATP binding cassette») (279). PstS est une protéine périplasmique associée à la membrane interne et lie le  $P_i$  disponible avec une grande affinité ( $K_d$  est de  $1 \mu\text{M}$ ). PstS possède un seul site de liaison pour le  $P_i$  et peut transporter les anions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  (272). Le transit du  $P_i$  vers l'intérieur de la cellule s'effectue grâce à deux protéines, soit PstA et PstC, qui forment un canal dans la membrane interne (MI). PstB est associée à la MI du côté cytosolique. Cette protéine, interagit sous forme de dimère avec PstC (163) et est impliquée dans la libération de l'énergie nécessaire à la translocation du  $P_i$  via le canal formé par PstA et PstC.



**Figure 1. Structure génétique du transcrit de l'opéron *pst*.**

En 5' de l'ARNm, la région promotrice de l'opéron *pst* est montrée avec ses deux boîtes Pho recouvrant la région -35 (Voir section 2.3.4, p.20) et la région -10 (149). Les boucles en épingles à cheveux représentent des structures secondaires dans l'ARNm. Celles-ci pourraient protéger les transcrits contre les ribonucléases. La région intergénique entre *pstA* et *pstB* contient un promoteur putatif. Cette même région est un régulateur positif de la traduction de *rpoS* (Voir section 3.5.3.1, p186). Les lignes rouges représentent les transcrits majeurs de l'opéron *pst*. Figure adaptée de Aguena *et al.* (2002)

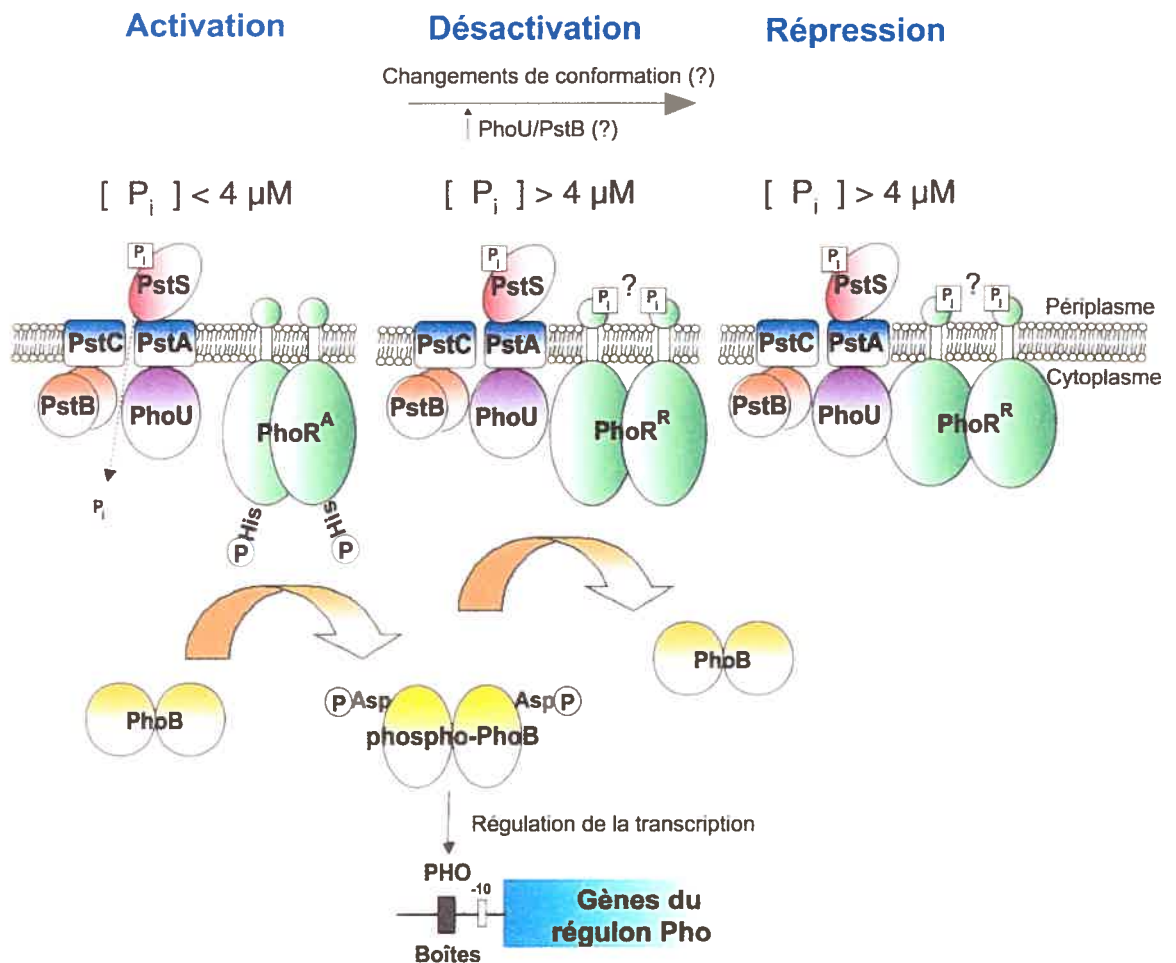
PstB possède un seul motif de liaison à l'ATP (273). L'acquisition du phosphate par le biais de ce système est donc un processus énergétiquement coûteux nécessitant l'hydrolyse de l'ATP.

### ***2.3.3 Le système à deux composantes PhoR/PhoB : domaine et mécanisme du phospho-relai entre PhoR et PhoB***

#### ***2.3.3.1 L'histidine kinase PhoR***

PhoR est une histidine kinase (HK) de 431 acides aminés qui se localise dans la MI (Figure 2). PhoR serait susceptible de répondre aux variations de concentrations périplasmiques en phosphate. Cette HK est constituée de deux domaines, soit un domaine catalytique et un domaine bi-fonctionnel de dimérisation et d'auto-phosphorylation. PhoR est ancrée dans la membrane cytosolique par sa partie N-terminale. Un petit domaine d'environ sept acides aminés fait face à l'espace périplasmique (273). La majeure partie de PhoR, incluant la région C-terminale, est située dans le cytosol. Cette partie porte les domaines catalytiques de la protéine (273). Lorsque les concentrations périplasmiques en phosphate chutent sous 4  $\mu\text{M}$ , il y a modification conformationnelle de la protéine PhoR, qui acquiert alors une activité auto-kinase. Cette activité est ATP dépendante (91). PhoR active s'auto-phosphoryle sur le résidu histidine conservé (en position 213); puis un phospho-transfert s'opère, relayant le groupement phosphorylé vers le résidu d'acide aspartique de PhoB (272).





**Figure 2. Contrôle du régulon Pho et signaux de transduction transmembranaire induit par le phosphate inorganique ( $P_i$ ).**

Les petits carrés marquent des sites putatifs pour la liaison du  $P_i$  sur PstS et PhoR. Annotation: PhoB : régulateur de la transcription des gènes du régulon Pho (régulateur de la réponse (RR); PhoR : protéine senseur et histidine kinase (HK) (A, autophosphorylée; R, réprimée); PstS : protéine périplasmique liant le  $P_i$  avec grande affinité; PstA et PstC : protéines intégrales de la membrane interne (MI) qui forment un canal permettant le passage du  $P_i$  vers le cytosol; PstB : ATPase qui libère l'énergie nécessaire au processus d'acquisition du  $P_i$ ; PhoU : régulateur négatif du régulon Pho. Voir le texte pour les détails. Figure tirée de Lamarche M.G., Wanner B.L., Crépin S et Harel J. (2007)

### 2.3.3.2 Le régulateur de la réponse *PhoB*

La protéine PhoB est le régulateur de la réponse (RR) des gènes appartenant au régulon Pho. PhoB est une protéine de 229 acides aminés composée de deux domaines fonctionnels, soit le domaine receveur (RD) et le domaine bi-fonctionnel de liaison à l'ADN et de transactivation (DBTD). Le RD est un domaine de 124 acides aminés situé en N-terminal, alors que le DBTD, de 99 acides aminés, est situé en C-terminal. Ce dernier est responsable de la liaison entre PhoB et l'ADN et de la transactivation de la transcription (26). PhoB est retrouvée sous forme de dimère, prenant une conformation différente en état activé ou inactivé (9). La phosphorylation survient sur le résidu d'acide aspartique 53 du RD (272, 274) et nécessite la présence de  $Mg^{2+}$  comme co-facteur. Le  $Mg^{2+}$  est lié au site actif du RD (229, 230). La liaison du  $Mg^{2+}$  et la phosphorylation de PhoB par PhoR provoquent un changement de conformation au sein de la protéine (5, 66). Le dimère de PhoB, sous sa forme phosphorylée (PhoB-P), peut alors interagir avec la sous-unité  $\sigma^{70}$  de l'ARN polymérase, facilitant ainsi l'initiation de la transcription des gènes Pho dépendants (26, 148, 232, 272).

Lorsque les concentrations en phosphate deviennent non-limitantes, l'inhibition de l'activation s'effectue de manière PhoR et Pst-dépendante (91). Dans cette situation, PhoR n'agit plus comme une auto-kinase, mais comme une phosphatase responsable de la déphosphorylation de PhoB-P. De plus, en condition non limitante pour le phosphate, le RD non-phosphorylé de la

protéine PhoB inhibe l'activité du domaine effecteur (26, 66). Les protéines du système Pst sont aussi nécessaires pour la régulation négative du régulon Pho (91). La désactivation et la répression de Pho nécessitent donc un excès de  $P_i$  extracellulaire et la présence du système Pst incluant la protéine PhoU (197) (Voir la section 2.3.5, p.21, qui traite de la protéine PhoU). Ce mécanisme est indépendant du transport du  $P_i$  fait par Pst (235). PhoB ne fait pas partie du complexe de répression (273). Le mécanisme de désactivation et de répression s'opère probablement par le biais d'interactions protéine-protéine entre Pst/PhoU et la protéine PhoR (235). Encore aujourd'hui, les mécanismes exacts d'activation et de répression du régulon Pho ne sont pas connus.

### 2.3.3.3 *Modèles moléculaires d'activation et de répression du régulon Pho*

Deux modèles théoriques pour l'activation et la répression du régulon Pho étaient considérés jusqu'à tout récemment, soit le modèle stoechiométrique et le modèle par sites de liaison du  $P_i$ . En effet, des données récentes pourraient modifier ces modèles. Il est intéressant de les décrire brièvement puisqu'ils peuvent toujours expliquer en partie le phénomène.

Dans le modèle stoechiométrique d'activation et de répression du régulon Pho, lorsque la concentration environnementale en  $P_i$  est élevée, PstS serait saturé à l'équilibre par le  $P_i$  périplasmique. PhoR serait en contact avec le système Pst sous sa forme réprimée. Lorsque les concentrations en  $P_i$  sont inférieures à 4  $\mu\text{M}$ , la forme  $P_i$  libre de PstS induirait probablement un

changement de conformation dans Pst. Ceci provoquerait la dissociation de PhoR, qui deviendrait active. PhoR pourrait ou non être sous forme de dimère ou d'oligomère dans sa forme activée ou désactivée (273).

Dans le modèle d'activation et de répression du régulon Pho par les sites de liaisons du  $P_i$ , PhoR serait toujours en association avec le système Pst. En condition non-limitante pour le phosphate, PstS et PhoR seraient saturées à l'équilibre par le  $P_i$ . La répression du régulon Pho se produirait lorsque les deux sites sont occupés. En condition de carence en phosphate, le  $P_i$  lierait préférentiellement PstS de par sa plus grande affinité pour celle-ci. Dans cette situation, PhoR serait donc sous sa forme active (273). La proximité de PhoR et PstS permettrait donc la compétition pour le  $P_i$ . Comme présenté à la Figure 2, la désactivation est la transition entre l'état d'activation et l'état de répression du régulon Pho. En plus de Pst et de PhoR, la désactivation et la répression du régulon Pho nécessite aussi la présence de la protéine PhoU. Le rôle de cette protéine est présenté plus en détails à la section 2.3.5, p. 21.

#### 2.3.3.4 *L'activation continue du régulon Pho chez les mutants Pst*

Le système Pst est présent dans les cellules sauvages en condition non-limitante pour le phosphate en raison d'un taux basal d'expression. Cette observation simple est faite sur la base qu'une mutation dans *pstSCAB-phoU* affecte le contrôle du régulon Pho (235). Chez *E. coli* et plusieurs autres bactéries, des mutations dans l'opéron *pst-phoU* résultent en l'activation continue du TCS PhoR/PhoB, peu importe la concentration environnementale

en phosphate. Les mécanismes pouvant expliquer ce phénomène ne sont pas encore connus. Une mutation non-sens en N-terminal dans la protéine PstA résulte en la dérépression partielle du régulon Pho (environ 10%) (45, 287). Cette mutation abolit le transport spécifique du  $P_i$ . Ainsi, la répression du régulon Pho semble nécessiter une conformation particulière au sein des protéines du système Pst, probablement pour permettre des interactions avec PhoR. Le transport du  $P_i$  en soit n'est pas important pour le contrôle du régulon Pho. Chez des mutants Pst d'*E. coli*, il n'y a pas de répression partielle du régulon Pho en condition non limitante pour le phosphate, contrairement à certaines autres espèces bactériennes comme *Pseudomonas aureofaciens*. En effet, ces dernières démontrent, malgré des défauts de répression de Pho, une réduction de l'expression de ce régulon (163).

#### 2.3.4 Les boîtes Pho

Les gènes appartenant au régulon Pho possèdent des sites de reconnaissance de la protéine régulatrice PhoB appelés boîtes Pho (« Pho box »). En effet, ces gènes ont une ou plusieurs boîtes Pho situées en amont du codon d'initiation, à laquelle ou auxquelles PhoB-P se fixe avec grande affinité (272). De façon générale, cette séquence remplace la région -35 du promoteur (232) et se termine 10 paires de bases (pb) en amont de la région -10 du promoteur (262). Les gènes inhibés par PhoB-P ont une boîte Pho en amont ou recouvrant la région -35. Cependant, les sites de liaison de PhoB-P à l'ADN dans les cas de régulation négative ne sont pas caractérisés (100, 226, 288). Une boîte Pho est définie par la séquence consensus : 5'-

CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)-3'(272). Celle-ci se décrit comme étant deux séquences répétées directes et séparées par 4 pb constituant une région AT-riche. Une boîte Pho pourrait en fait être composée de 22 pb avec deux répétitions de 11 pb. Les 4 dernières pb de la deuxième répétition semblent être moins conservées, ce qui explique qu'elles ne sont pas souvent identifiées comme faisant partie de la boîte Pho (26). Chaque sous-unité DBTD de PhoB reconnaît une séquence répétée sur le brin d'ADN correspondant à exactement un tour d'hélice (11 pb) (66). On croit que plusieurs boîtes Pho augmenteraient l'affinité de PhoB vis-à-vis des gènes ayant des boîtes Pho moins conservées (26).

### 2.3.5 La protéine PhoU

Le gène *phoU* est le plus distal de la partie 5' de l'opéron *pst*. PhoU est une protéine cytosolique associée à la MI et son rôle n'est pas encore bien décrit. PhoU est un régulateur négatif du régulon Pho et ne participe pas au transport du  $P_i$  (1, 91, 235). PhoU est probablement localisée à la face interne de la membrane cytosolique et interagirait avec PhoR ou le système Pst (165, 273). Oganesyanyan et ses collaborateurs (2005) ont suggéré que PhoU pourrait agir en liant PhoR, PhoB ou le complexe transitoire PhoR/PhoB pour ainsi promouvoir la déphosphorylation de phospho-PhoB ou inhiber la formation du complexe PhoR/PhoB (174). Pour être active, la protéine PhoU pourrait lier le fer comme co-facteur (138). Comme expliqué par les modèles d'activation et de répression, il est probable que la fixation du  $P_i$  à PstS engendre des changements de conformation au sein des protéines du système Pst. Ces

changements pourraient affecter la fonction de PhoU qui pourrait alors agir sur PhoR ou PhoB pour désactiver et inhiber le TCS PhoR/PhoB (269). PhoU pourrait être un répresseur ou une sous-unité d'un répresseur pour PhoB ou une enzyme de conversion du phosphate en effecteur activant un répresseur de PhoB (165). Ainsi le transporteur Pst et PhoU sont des régulateurs négatifs du régulon Pho (232, 272). En plus de son rôle dans la régulation négative de PhoR/PhoB, il a été proposé que PhoU pourrait aussi être impliquée dans le métabolisme du phosphate, en ayant par exemple un rôle à jouer dans la synthèse de l'ATP (235). L'association entre une telle enzyme et le système Pst serait en effet avantageuse pour permettre la survie de la cellule en situation de carence en phosphate. PhoU pourrait aussi être impliquée dans la synthèse d'autres molécules phosphatées ou dans l'incorporation du  $P_i$  dans le métabolisme central de la cellule (165, 235).

### 2.3.6 Les systèmes Pit et autres systèmes pour l'acquisition du $P_i$

PitA est un système uniprotéique impliqué dans le transport du  $P_i$  (Pit :  $P_i$  transport) et est exprimé de façon continue. PitA est un transporteur de faible affinité et de grande vitesse ( $K_m = 38,2 \mu M$ ;  $V_{max} 55 \text{ nmol de } P_i/\text{min/mg de protéines}$ ) (260, 272). En condition non limitante pour le phosphate, le  $P_i$  est transporté par PitA alors que Pho est réprimé (235). Il existe un deuxième système Pit pour le transport du  $P_i$ , soit le système uniprotéique PitB (100, 106). Ce dernier possède une homologie de séquence de 75% avec *pitA*. Le gène *pitB*, contrairement à *pitA*, est influencé par Pho. L'inactivation de *phoBR* entraîne la prise du  $P_i$  par PitB (100). En plus de PitA, de PitB et du système Pst, les

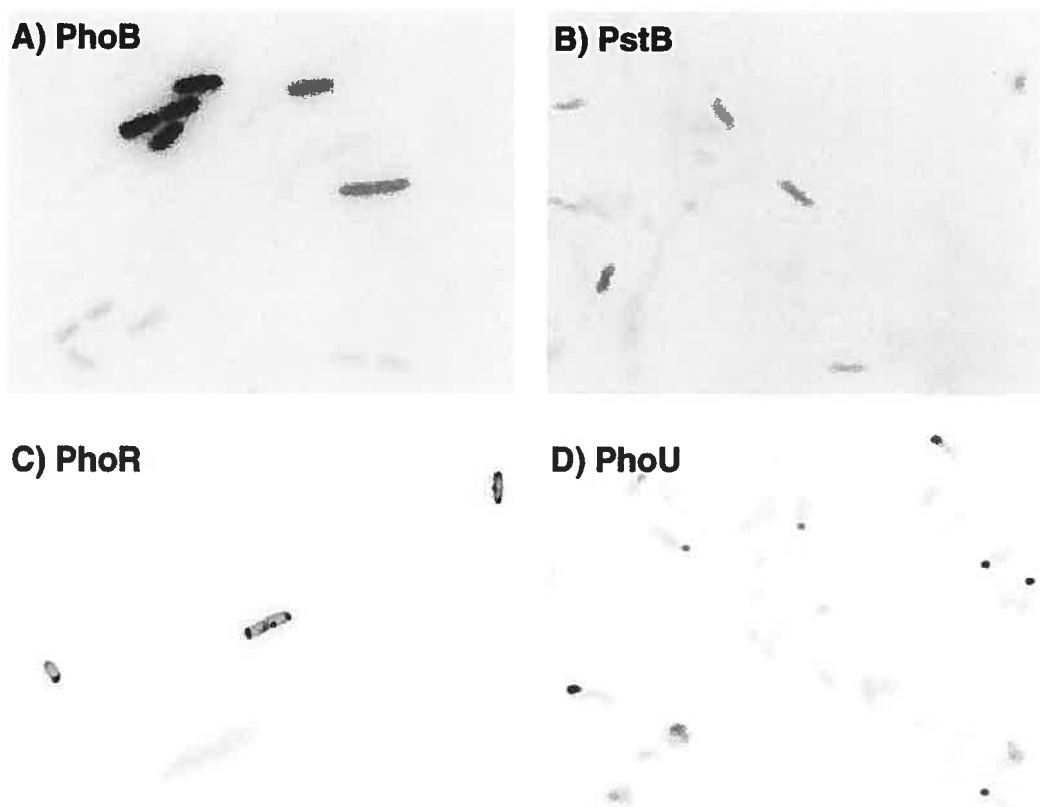
systemes Glp et Uhp peuvent aussi accepter le  $P_i$  (faible affinité) comme analogue du G3P ou du glucose-6-phosphate (G6P) respectivement. Cependant, en absence de Pit et Pst, ces systemes seuls ne peuvent supporter la croissance bacterienne. Finalement, l'absence de PitA n'a pas d'effet sur la croissance bacterienne, sur le  $P_i$  intra-cellulaire ou sur la regulation du regulon Pho (272).

Par ailleurs, le systeme PitA permet le transport de complexes metal-phosphate ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  et  $Co^{2+}$  sous forme de metal- $HPO_4$ ) neutres et solubles (20) a travers la membrane cytoplasmique et est dependant de la force proton-motrice (100). Ainsi, PitA a probablement un role a jouer dans la detoxification de la cellule lorsque les concentrations en ions metalliques toxiques sont trop elevees (20). Lorsque le  $P_i$  est relache des reserves intracellulaires de poly $P_i$ , grace a l'activite de la poly $P_i$  phosphatase Ppx, le  $P_i$  ainsi rendu disponible est subséquemment lie aux cations toxiques et evacue de la cellule par le biais du systeme PitA (20).

### ***2.3.7 Réflexion sur les mecanismes de controle du regulon Pho***

Les modeles d'activation et de repression expliques ci-dessus pourraient ne pas etre tout a fait justes a la lumiere de resultats obtenus récemment. En effet, en observant les clones Pst, PhoU, PhoB et PhoR, de la collection ASKA (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/top/top.jsp>) en microscopie confocale, il a ete observe que PhoU et PhoR sont localisees aux poles cellulaires, alors que le systeme Pst est distribue uniformement tout autour de la cellule (Figure 3).





**Figure 3. Images de microscopie confocale obtenues de différents clones de la collection ASKA (« A Complete Set of *E. coli* K-12 ORF Archive ») (123). (A et B) Clones exprimant la GFP en fusion protéique avec PhoB et PstB respectivement. La distribution uniforme de ces deux protéines est visible. Les clones ASKA PstS, PstC et PstA montrent une localisation similaire à celle de ces clones (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/top/top.jsp>). (C et D) Clones exprimant la GFP en fusion protéique avec PhoR et PhoU respectivement. Leur localisation aux pôles cellulaires est bien visible.**

La co-localisation de PhoU et PhoR appuie le rôle de PhoU comme régulateur négatif du régulon Pho qui agirait *via* une interaction avec PhoR. Chez *Bacillus subtilis*, le domaine cytoplasmique de PhoR est suffisant pour l'induction du régulon Pho en condition de carence en phosphate (223). Il pourrait en être de même chez *E. coli*. Ainsi, le petit domaine périplasmique de PhoR n'agirait pas comme senseur du  $P_i$ . Par ailleurs, il a été observé par fusion protéique utilisant la  $\beta$ -galactosidase, que l'expression de *phoU* est élevée pour les cellules en phase exponentielle de croissance, alors qu'elle diminue lors de l'entrée en phase stationnaire de croissance (165). Ainsi, le gène *phoU* pourrait également être soumis à une régulation autogène, c'est-à-dire que PhoU agirait comme un régulateur de sa propre transcription (165). En accord, il y a augmentation de l'expression de PhoU chez les mutants *phoB* en condition non limitante pour le phosphate (165), ce qui suggère que PhoB n'est pas le seul régulateur de *phoU*. La région génétique de régulation du gène *phoU* pourrait être localisée dans la région intergénique entre *pstA* et *pstB* ou à l'intérieur de *pstB* (Figure 1). Par ailleurs, l'état d'activation continue du TCS PhoR/PhoB chez les mutants *pst* n'est pas la conséquence d'une diminution de la concentration intracellulaire en phosphate, puisque cette dernière est maintenue par des systèmes secondaires comme le système PitA. Cependant, il a été observé que l'activation continue observée chez un mutant *pstS* pouvait être restaurée en augmentant l'activité des transporteurs uniprotéiques PitA et PitB. Le rôle précis du phosphate intracellulaire dans l'activation du régulon Pho reste donc à découvrir (107). Le  $P_i$  pourrait moduler l'activité de PhoU ou

servir de substrat pour la synthèse d'un composé important pour la régulation du régulon Pho (107).

### 2.3.8 La régulation croisée entre les TCS

PhoB peut être phosphorylée par d'autres HK ou molécules bioréactives, en conséquence d'un phénomène nommé « cross-talk ». Le « cross-talk » est défini comme étant le transfert de groupements phosphoryles d'une HK vers un régulateur de réponse non-légitime (ou non-analogue) (263). Dans certaines conditions, la molécule bioréactive acétyl-phosphate (293) et la protéine CreC, régulateur catabolique, peuvent activer PhoB en absence de PhoR (235, 275). L'activation de PhoB par l'acétyl-phosphate pourrait également nécessiter l'activité d'une HK non-légitime (122). La diminution du ratio ATP/acétyl-phosphate mène à l'activation du régulon Pho (273). CreC/CreB contrôle le régulon Cre composé de huit unités transcriptionnelles incluant *ackA-pta*, une voie bidirectionnelle de conversion du pyruvate en ATP, produisant l'acétyl-phosphate comme produit intermédiaire (7). Curieusement, cette voie métabolique appartient au régulon Pho chez *Sinorhizobium meliloti* (240). En absence de PhoR, CreC peut phosphoryler PhoB, ce qui résulte en l'activation partielle du régulon Pho. Aussi, plusieurs autres gènes affectent l'état d'activation du régulon Pho en absence de PhoR (*cya*, *icd*, *mdh*, *ops*, *ppk*, *pstH1*, *rpiA*, *pur*, etc.) (273). Il est probable que ces gènes influencent l'état d'activation du régulon Pho *via* Cre et la voie de biosynthèse de l'acétyl-phosphate puisqu'ils sont, pour la plupart, connectés au métabolisme central de la cellule. Chez *B. subtilis*, la protéine CcpA (« carbon catabolite protein A »)

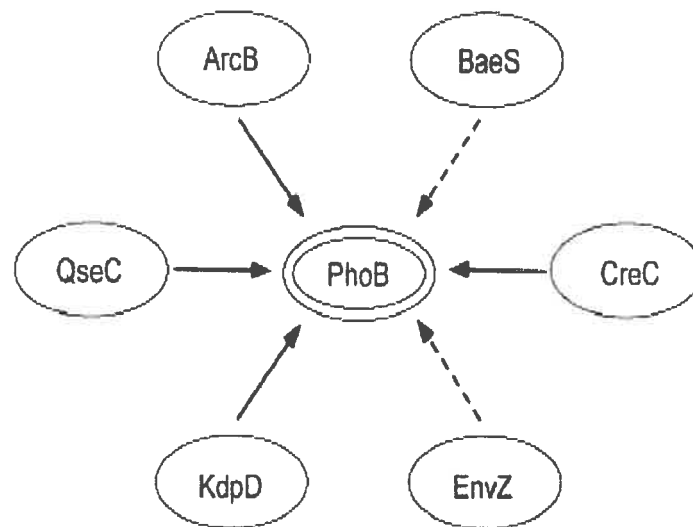
agit comme régulateur négatif du régulon Pho en situation d'excès de phosphate et de certaines sources de carbone (187). Comme il a été observé pour *E. coli*, plusieurs indices suggèrent une relation entre Pho et le métabolisme du carbone. Cependant, un lien direct n'a toujours pas été établi.

### ***2.3.9 Importance biologique du « cross-talk »***

La connexion entre les différents domaines impliqués dans les phosphotransferts d'une voie en particulier est beaucoup plus importante que la connexion entre des voies signalétiques non-analogues (« non-cognate ») (263). C'est pourquoi, dans le cas du TCS PhoR/PhoB, la phosphorylation par CreC par exemple, n'est significativement mesurable que lorsque PhoR est absent. Malgré cela, la signification biologique de tels phénomènes n'est pas à négliger puisqu'ils peuvent contribuer à l'activation stochastique de l'expression génique (voir section suivante : 2.3.10). Des études récentes ont démontré qu'au moins 6 HK non-analogues (QseC, ArcB, CreC, KdpD, BaeS et EnvZ) peuvent activer PhoB en absence de PhoR et d'acétyl-phosphate (Figure 4) (71, 92, 122, 169, 263, 270, 273-276, 289, 303). Ces régulateurs appartiennent à la famille OmpR-PhoB composée de 14 membres.

### ***2.3.10 Activation stochastique de l'expression génique***

L'activation stochastique de l'expression génique est un phénomène se produisant naturellement dans une cellule. Ce phénomène est aussi appelé bruit de fond de l'expression génique. L'observation de l'état d'activation du régulon Pho à l'échelle des cellules individuelles, utilisant la GFP (« green fluorescent



**Figure 4. Activation de PhoB par des histidines kinases (HK) non analogues.** Les ovals blancs représentent des HK qui activent fortement PhoB, c'est-à-dire que la régulation croisée entre celles-ci et PhoB survient même en présence des RR analogues. Les ovals gris représentent des HK qui activent PhoB seulement en absence de leur RR analogue. Figure tirée de Zhou L, Grégori G, *et al.* (2005).

proteïn ») comme gène rapporteur lors d'analyses par FACS (« Fluorescent Activated Cells Sorting »), a révélé une activation « tout ou rien » du régulon Pho (199, 303). Ainsi, une proportion de cellules d'*E. coli* restent non-induites même en présence du signal d'activation. Il ne semble donc pas y avoir d'activation graduelle du régulon Pho. L'activation stochastique du régulon Pho se produit aussi en conséquence de l'activation de PhoB par PhoR (Zhou et Wanner, données non publiées). Les facteurs déterminant le seuil d'activation du régulon Pho sont inconnus. Il est probable que les HK et les RR, phosphorylés ou non, ainsi que d'autres facteurs contribuent au phénomène d'activation seuil (303). La régulation autogène du TCS PhoR/PhoB doit contribuer au comportement stochastique de l'expression du régulon Pho. Ces phénomènes favorisent l'émergence de phénotypes multiples et stables au sein d'une population bactérienne génétiquement identique. Ils favorisent aussi la propagation et l'auto-amplification du bruit de fond au sein des gènes situés en aval dans la chaîne de régulation (199, 227, 272). L'activation stochastique de l'expression génique est donc un phénomène impliqué dans l'apparition de sous-populations clonales pouvant avoir un *fitness* plus grand pour de nouvelles niches écologiques, mais aussi pour permettre la survie à des stress environnementaux subis. Le bruit de fond génique est donc un phénomène de sélection naturelle important pour la survie des pathogènes dans l'environnement, mais aussi à l'intérieur de l'hôte.

### **3. La paroi des bactéries à Gram-négatif**

### 3.1 Structure globale de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif

La paroi des bactéries à Gram-négatif est une barrière à perméabilité sélective, très efficace pour protéger la bactérie contre les nombreux stress pouvant être rencontrés dans l'environnement et dans l'hôte (167). Cette paroi est d'une complexité remarquable (Figure 5). Globalement, elle est composée d'une membrane interne (MI) et une externe (ME), celles-ci étant séparées par l'espace périplasmique. Le périplasme contient un mince réseau de peptidoglycan donnant à la fois résistance et forme à la cellule bactérienne. La ME est composée d'un feuillet interne essentiellement composé de phospholipides, majoritairement de phosphatidyléthanolamine, et d'un feuillet externe composé principalement d'un glycolipide complexe : les lipopolysaccharides (LPS) (191). La partie membranaire des LPS est nommée lipide A et est aussi connue sous l'appellation d'endotoxine. Le lipide A sert d'ancrage dans la ME au reste de la molécule de LPS. Ces caractéristiques font de la ME une bicouche lipidique asymétrique. Le reste de la molécule de LPS est composé d'une chaîne saccharidique plus ou moins longue projetée dans le milieu extracellulaire. Les LPS couvrent environ 75% du feuillet externe de la ME et il y a environ deux millions de molécules de lipide A dans une cellule de *E. coli* (256). Plusieurs types protéiques sont insérés dans la ME, soit intégralement ou partiellement, i.e. les protéines de la ME (OMP : « outer-membrane protein »). En effet, le reste de la surface bactérienne est principalement occupé par les porines (256). Ces dernières forment des canaux nécessaires à l'import et à l'export de différents éléments ou composés possédant une taille inférieure à environ 600 Da. Aussi, les lipoprotéines de

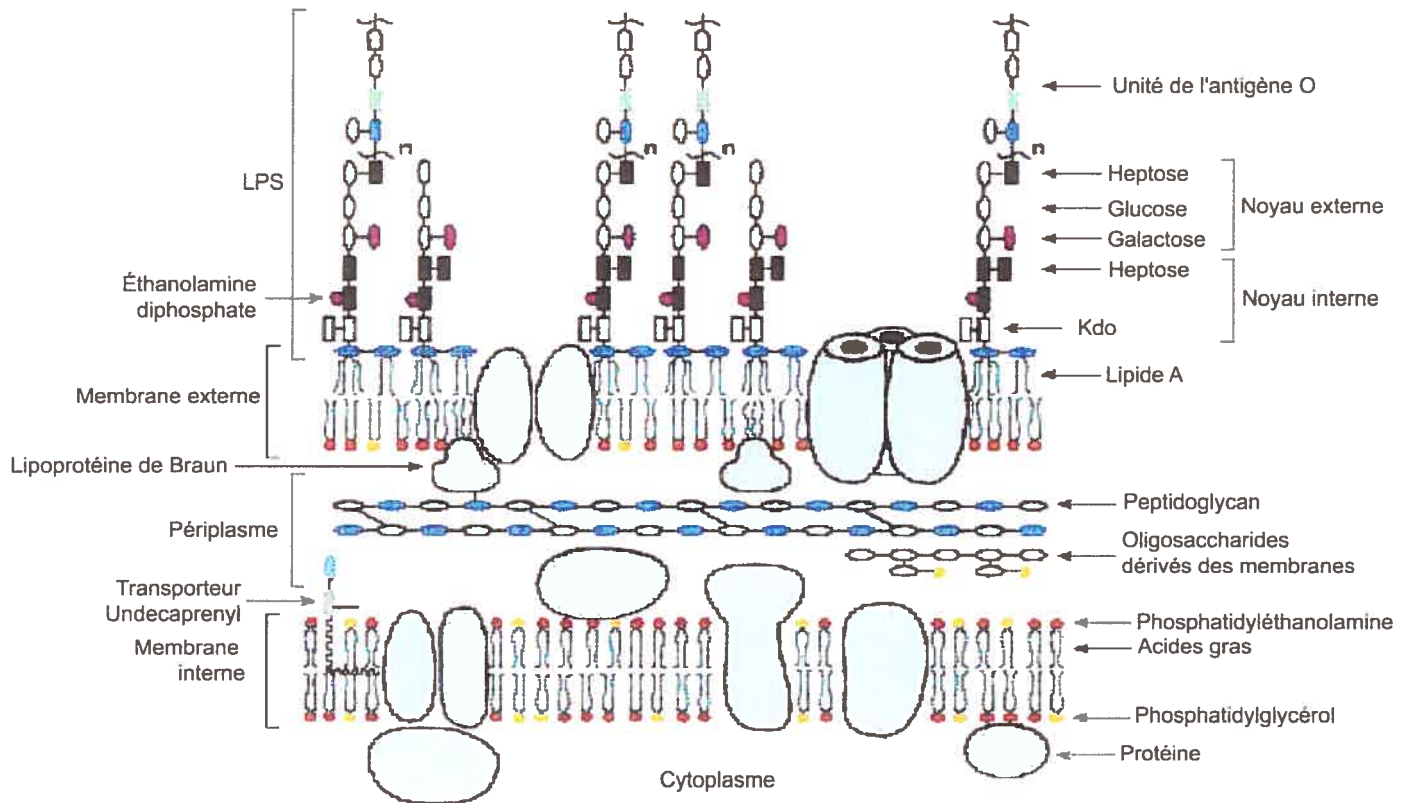
Braun font le pont entre le peptidoglycan et le feuillet interne de la ME, contribuant à la stabilité et à la robustesse de la cellule. Pour leur part, les deux feuillets de la MI sont composés de phospholipides et de protéines (Figure 5).

## 3.2 Les lipopolysaccharides (LPS)

### 3.2.1 Structure globale des LPS

Les LPS sont divisés conceptuellement en trois parties : le lipide A, le noyau oligosaccharidique, en position proximale au lipide A et la chaîne saccharidique aussi nommée chaîne O ou antigène O (Figure 5) (38). Le noyau du LPS est attaché de façon covalente au lipide A et peut être à son tour divisé en deux parties, soit le noyau interne et le noyau externe (Figure 5). Le noyau interne est composé d'acides 3-kéto-déoxy-D-manno-octulosoniques (KDO) et des molécules de L-glycero-D-manno-heptose. Le noyau interne est phosphorylé et est conservé parmi les Enterobacteriaceae. Le noyau externe est quant à lui variable. L'antigène O consiste en une chaîne plus ou moins longue d'unités répétées de sucres. Cette chaîne peut varier en longueur de 1 à 40 unités de sucres et chaque unité peut être composée de 3 à 12 sucres individuels (191). Chez *E. coli*, il existe environ 170 différents types d'antigènes O. L'antigène O est une molécule hydrophile, neutre ou acide et qui est typiquement chargée négativement. Les membres de la famille des Enterobacteriaceae possèdent aussi un glycolipide de surface unique nommé antigène commun des entérobactéries (ECA). L'ECA est composé d'une sous-unité tri-saccharide ( $\alpha$ -D-Fuc4NAc (-1-4-)  $\beta$ -D-ManNAc (-1-4-)  $\alpha$ -D-GlcNAc)





**Figure 5. Structure de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram-négatif.**

Les différentes composantes structurales de la MI, de la ME et du périplasm sont montrées. Noter la structure des lipopolysaccharides (LPS), composés du lipide A, du noyau interne et externe et d'unités répétées de sucres (antigène-O). Voir le texte pour la description. Figure adaptée de Raetz *et al.* (2007).

répétée liant le phosphodiacylglycérol et le noyau des LPS et des oligosaccharides (16).

Les LPS sont un facteur de protection important contre les différentes molécules antimicrobiennes rencontrées dans l'hôte (Voir section 4, p.39) et peuvent contribuer à la pathogénie de l'infection *via* leurs effets sur la réponse inflammatoire et immunologique de l'hôte (Voir section 3.2.3, p.34). Ceux-ci rendent la surface cellulaire plus hydrophile, ce qui protège la cellule contre la déshydratation (16). Les LPS participent à la modulation de la perméabilité membranaire et contribuent par le fait même à bloquer l'accès aux molécules antibactériennes (256). De plus, les LPS peuvent bloquer physiquement différentes molécules antimicrobiennes puisqu'ils provoquent un encombrement stérique à la surface de la cellule bactérienne. Les LPS protègent contre la phagocytose et augmentent la diversité antigénique (16).

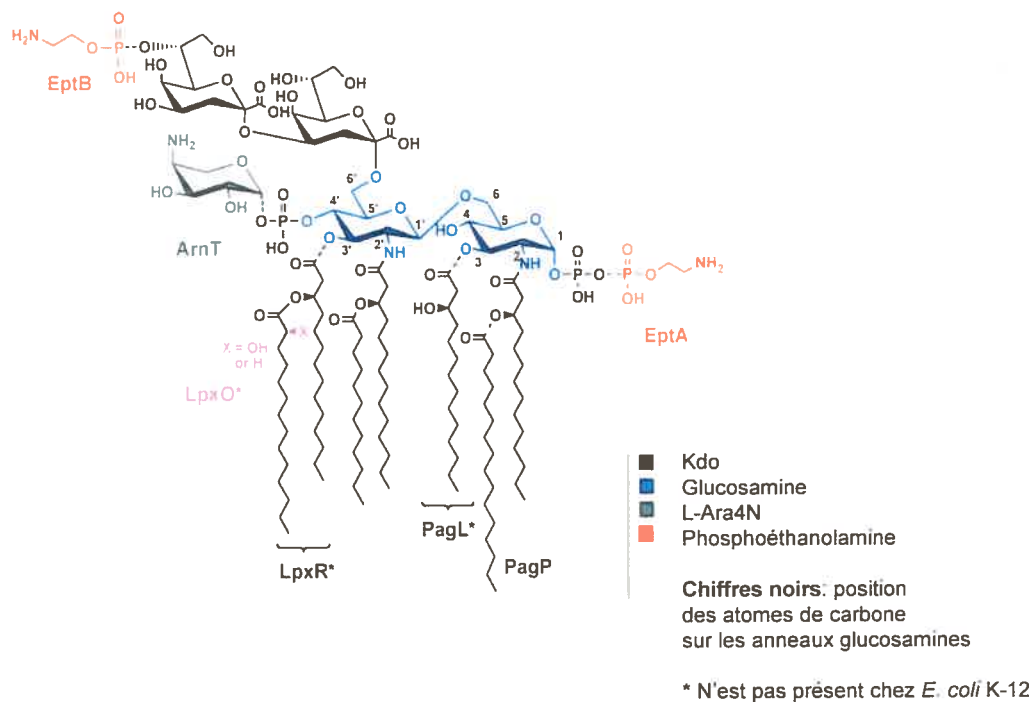
### ***3.2.2 Le lipide A : structure prototype du lipide A chez E. coli et Salmonella Typhimurium***

Le lipide A est conservé entre les différentes souches de *E. coli* (Figure 6). Il s'agit d'une molécule hydrophobe constituée d'un squelette de glucosaminy- $\beta(1\rightarrow6)$ -glucosamine dans lequel les résidus glucosamines sont phosphorylés par un groupement phosphomonoester à la position 4' et par un groupement phosphoryl à la position 1 (191). Cette structure *bis*-phosphorylée est présente dans deux tiers des molécules de lipide A, alors que le tiers restant des molécules possèdent un groupement pyrophosphate en position 1, donnant

lieu à une molécule de lipide A *tris*-phosphorylée. Quatre chaînes  $\beta$ -hydroxymyristates sont liées directement au squelette glucosamine aux positions 2, 3, 2' et 3', tandis que deux chaînes sont estérifiées à l'extrémité non-réductrice des résidus myristates 2' et 3'. Toutes les souches de *E. coli* possèdent le lipide A et au moins deux résidus KDO dans la région du noyau du LPS, puisque ceux-ci sont essentiels au maintien de l'intégrité de la membrane externe (Voir section 3.2.3, p.34 et 3.3.3, p.175).

### ***3.2.3 L'activité immunostimulatrice du lipide A***

Le lipide A est aussi appelé endotoxine à cause de sa nature pyrogène et sa capacité à causer des chocs septiques lors d'infections bactériennes (2). Le lipide A initie des cascades de médiateurs de l'inflammation chez l'hôte. Il lie une protéine de phase aiguë présente dans le sérum (LBP; LPS-binding protein). Cette liaison facilite le transfert du complexe LBP-lipide A vers les CD14. CD14 est une glycoprotéine de surface trouvée sur les macrophages, les monocytes et les neutrophiles. Il existe aussi une forme soluble de CD14 présente dans le sérum (191). Le domaine N-terminal de CD14 semble être le site de liaison aux LPS et est suffisant pour induire la réponse cellulaire (191). Subséquemment, le complexe, CD14-lipide A interagit avec MD2 et TLR4. Il y a alors cascade signalétique intra-cellulaire impliquant différentes MAP (« mitogen activated protein ») kinases et MKK (« MAP kinase kinase ») (191). Ceci résulte en la translocation de NF- $\kappa$ B (« nuclear factor- $\kappa$ B ») dans le noyau cellulaire et l'activation subséquente des gènes impliqués dans la réponse



**Figure 6. Structure du Kdo<sub>2</sub>-lipide A chez *E. coli* K-12 et *Salmonella*.** Les modifications covalentes du lipide A pouvant se produire chez ces espèces bactériennes sont aussi présentées. Dans certaines conditions, les groupements L-Ara4N et phosphoéthanolamine peuvent aussi être retrouvés en position 1 et 4' respectivement. Des variants du lipide A avec deux molécules de L-Ara4N ou de phosphoéthanolamine existent aussi. Un groupement diphosphoryle peut aussi occuper la position 1. Voir le texte pour les détails. Figure adaptée de Raetz *et al.* (2007)

inflammatoire, comme ceux impliqués dans la biosynthèse de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, 6 et 8, des radicaux oxygènes et de prostaglandine. Certains des médiateurs cellulaires ainsi produits peuvent amplifier leur propre synthèse. À concentration sanguine élevée, les lipides A engendrent donc une amplification de la réponse immunitaire. Les symptômes sont la fièvre, la coagulation, l'hypotension et peuvent engendrer un choc irréversible menant à la mort (159). La structure du lipide A est un facteur clé de son pouvoir immunomodulateur. En effet, la modification de sa structure peut atténuer grandement son caractère pyrogène.

#### ***3.2.4 L'importance des LPS pour la stabilité de la membrane externe***

La charge négative des LPS permet la capture d'ions cationiques. Ce phénomène est essentiel au maintien de l'intégrité de la surface bactérienne. Les résidus phosphates des noyaux internes et des molécules de lipide A lient les cations divalents (267, 295, 296). Il en résulte la création de pontages croisés entre les molécules de LPS favorisant la stabilité de la ME et le maintien de son intégrité (167, 168, 257). Pour cela, le noyau est requis pour améliorer la capacité de la ME à agir comme barrière aux antibiotiques.

### **3.3 La capsule ou antigènes K**

Les antigènes K sont des polymères acides entourant la cellule bactérienne. Ils sont constitués d'unités oligosaccharides répétées variant dans leurs compositions, embranchements et densité de charge (166). Les capsules

polysaccharidiques (CPS) masquent les LPS en analyses sérologiques. Chez *E. coli*, on distingue les différents types de CPS en quatre catégories (285) selon des critères physiques, chimiques et génétiques. La majorité des souches d'*E. coli* possèdent les gènes codant pour la capsule du groupe 1 qui est caractérisé par la présence d'acide colanique, tandis qu'un petit groupe possède les CPS du groupe 2,3 ou 4. Les groupes 2 et 3 sont les plus souvent associés aux souches d'*E. coli* pathogènes. Une souche peut exprimer à la fois des antigènes CPS de différents groupes. Il est possible de distinguer plus de 80 types capsulaires sérologiquement et chimiquement distincts (215).

### ***3.3.1 Les capsules polysaccharidiques de groupe 1 et 4***

Les capsules de groupe 1 (e.g. K27, K29 et K30) peuvent être retrouvées sous deux formes distinctes, soit la forme d'antigène K de haut poids moléculaire (> 100 kDa), soit sous la forme  $K_{LPS}$  de faible poids moléculaire (285). Ces deux types de CPS sont de même composition. Les CPS de groupe 1 sont acides en conséquence de leur composition en pyruvate et acide hexuronique. Elles possèdent une faible densité de charge et sont stables à 100°C. Le  $K_{LPS}$  est un oligosaccharide d'une ou de quelques unités répétées attachées à la membrane externe par une molécule de lipide A. L'ancrage membranaire de la forme de haut poids moléculaire n'est pas encore connu. La majorité des souches ExPEC sont capables de produire la capsule de groupe 1. Cette dernière n'a pas été démontrée comme étant importante dans la pathogénie de ces souches. Cependant, les ExPEC co-expriment souvent une

capsule de groupe 2 ou 3 (Voir section suivante : 3.3.2), qui elles sont importantes dans la pathogénie bactérienne (215). Les capsules de groupe 4 peuvent se retrouver sous les mêmes formes que celles du groupe 1 (e.g. O111 et K40). Elles ont cependant été classées séparément puisque les gènes associés au transport et à l'assemblage des CPS sont différents de ceux des CPS du groupe 1 (215).

### ***3.3.2 Les capsules polysaccharidiques de groupe 2 et 3***

Les CPS des groupes 2 et 3 sont rattachées à la cellule *via* des molécules d' $\alpha$ -glycérophosphate. Ces capsules possèdent une forte charge négative, sont hautement hydrophiles et possèdent un poids moléculaire d'environ 50 kDa (285). Les CPS des groupes 2 (e.g. K1 et K5) et 3 (e.g. K10, K54) peuvent être composées de plusieurs molécules acides tel que l'acide hexuronique, l'acide N-acétyl neuraminique (acide sialique) et l'acide glucuronique. Ces capsules ont une plus grande densité de charge et ne sont généralement pas stables à 100°C à pH 5-6. Il semble y avoir une prévalence de ces deux types de capsules chez les ExPEC. Il a été démontré que certaines combinaisons de CPS des groupes 2 et 3 et LPS engendrent un phénotype de résistance contre la phagocytose et l'effet bactéricide du complément (215).

## **4. Trois stress que la bactérie peut rencontrer chez l'hôte : les mécanismes de résistance dus aux structures de la surface bactérienne**

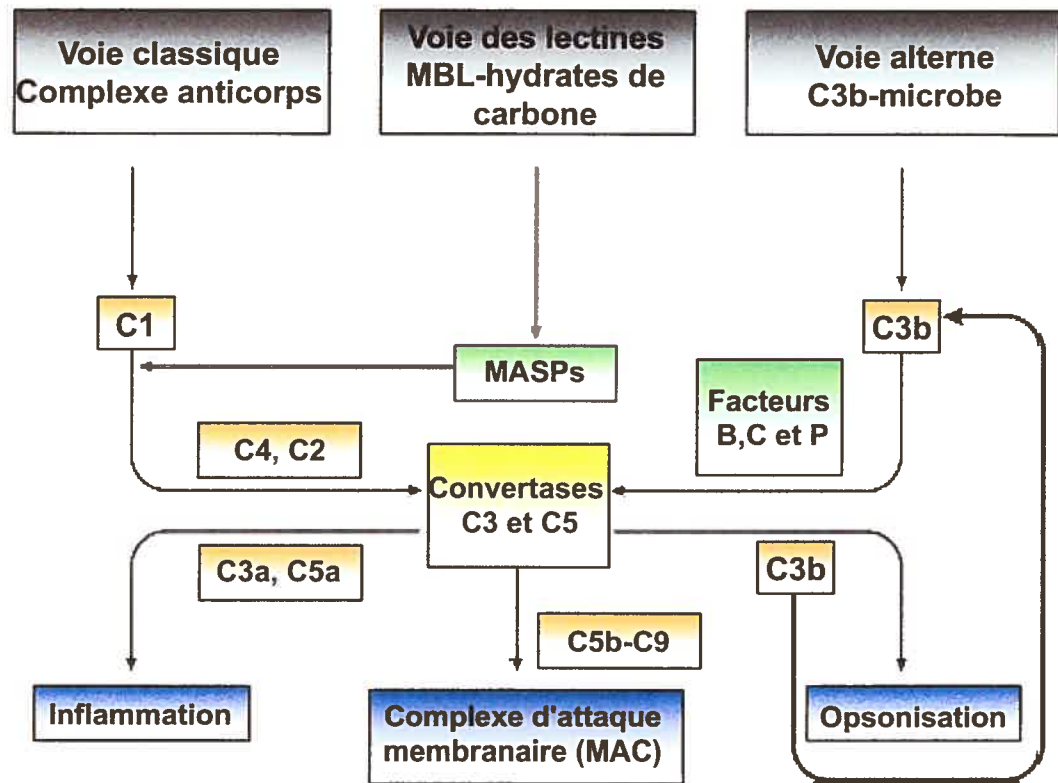
### **4.1 Effet bactériolytique du sérum**

La résistance à l'effet bactériolytique du sérum, c'est-à-dire aux voies alterne et classique du complément (Figure 7) (120), est multifactorielle et dépend des structures de la surface bactérienne comme les LPS et les CPS (48, 248). Aussi, les effets combinés des LPS et de certaines OMP sont en corrélation avec la capacité d'une souche d'*E. coli* à causer la septicémie et la mort (129) puisqu'ils favorisent la résistance à l'effet bactéricide des voies alterne et classique du complément.

#### ***4.1.1 La capsule et la résistance à l'effet bactériolytique du sérum***

La CPS agit comme première barrière physique contre les facteurs hostiles de l'environnement. La capacité de la CPS à bloquer l'accession de ces facteurs à la ME est dépendante de sa grosseur et de sa distribution. De plus, de par leur composition apparentée aux molécules retrouvées chez l'hôte, certaines capsules, comme celles composées d'acide sialique, ne sont que faiblement reconnues par le système immunitaire. Par exemple, la capsule K1 ne semble pas lier fortement le facteur du complément C3b. Ce mécanisme est nommé mimétisme. De plus, l'acide sialique favorise aussi la liaison du facteur H plutôt que du facteur B, ce qui favorise la conversion de C3b en molécule inactivée.





**Figure 7. Activation du système du complément.** Le complément peut être activé par le biais de trois voies distinctes : la voie classique, alterne et par les lectines. Le facteur B est clivé par le facteur D et agit comme l'élément C2 de la voie classique pour produire les C3 et C5 convertases. Le facteur P ou properdine stabilise les convertases de la voie alterne. Le point commun des voies d'activation du complément est la formation des convertases. Celles-ci produisent les anaphylatoxines C3a et C5a, le complexe d'attaque membranaire (MAC; C5b-C9) et l'opsonine C3b. Les anaphylatoxines agissent comme des chemokines, des chemoattractants et des activateurs de cellules immunocompétentes. Le MAC induit directement la lyse cellulaire. L'opsonine C3b induit l'adhérence immunitaire et la phagocytose des pathogènes. Elle provoque aussi une boucle à rétro-action positive au sein de la voie alterne du complément. MASPs : « mannose binding lectin (MBL)-associated serine protease ». Figure adaptée de Kemper et Atkinson (2007).

#### 4.1.2 Les LPS et la résistance à l'effet bactériolytique du sérum

*E. coli* peut résister à l'effet bactéricide du complément par substitution de l'antigène O des LPS. En effet, l'efficacité de la fixation des molécules du complément dépend de la nature des sucres qui composent le LPS (156). Par exemple, l'antigène O18 lie moins bien la protéine du complément C3b comparativement à d'autres sérogroupes comme O1. Aussi, les souches possédant une chaîne O plus longue, sont plus résistantes à l'effet bactéricide du complément que les souches ne possédant pas de chaîne O (113). La distribution et la densité des chaînes O sont des facteurs importants pour la résistance aux molécules du complément puisqu'elles déterminent l'encombrement stérique à la surface cellulaire (82). Ces facteurs interfèrent avec la formation de la cascade humorale du complément et du complexe d'attaque membranaire (MAC). Le MAC est un complexe de protéines amphiphiliques capable de s'insérer dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Cette insertion résulte en la dissipation du potentiel électrochimique et en la lyse cellulaire. Les LPS peuvent donc nuire à la formation du MAC par entrave physique ou en affectant la configuration de la formation de ce dernier. Comme vu précédemment, les chaînes acyles composant le lipide A sont déterminantes pour la perméabilité membranaire. Celles-ci déterminent aussi la fluidité du feuillet externe de la ME. De façon générale, plus il y a d'acides gras insaturés (UFA), plus la membrane est fluide. Une grande fluidité contribue à la sensibilité aux molécules du complément (286).

### **4.1.3 Les protéines de la membrane externes (OMP) et la résistance à l'effet bactériolytique du sérum**

Parmi, les protéines de la membrane externe (OMP) connues pour être impliquées dans la résistance à l'effet bactéricide du complément, les protéines Iss (72, 109, 171) et TraT (172, 184), souvent encodées sur un plasmide ColV ou F, sont effectivement très souvent associées à ce phénotype de résistance. Les mécanismes d'action sont peu connus, mais il semblerait que ces protéines seraient impliquées dans l'inhibition de la formation du MAC plutôt que dans la dégradation des composantes du complément. De façon similaire, le gène *bor* du phage  $\lambda$  augmente la résistance à l'effet bactéricide du sérum (13). Ce gène est homologue à 93% avec le gène *iss* de ColV. Finalement, les OMP des bactéries à Gram-négatif, comme la porine PhoE (Voir section 2.3.1.2, p.12), sont intimement associés avec les LPS, ce qui participe à la cohésion de la surface cellulaire et à l'entrave des molécules du complément pour l'accession vers la ME.

## **4.2 Les peptides cationiques antimicrobiens (CAMP)**

### **4.2.1 Où retrouve t-on les CAMP?**

Les CAMP sont présents dans toutes les sphères de la vie. En effet, ils sont présents chez les mammifères, les amphibiens, les insectes, les crustacés, les oiseaux, les plantes, les bactéries et les virus. Chez l'homme et les autres mammifères, les CAMP représentent environ 10-18% de toutes les espèces protéiques au sein des granules des neutrophiles, ces derniers ayant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée contre les micro-organismes et dans

la réponse inflammatoire. Les neutrophiles contiennent un grand éventail de peptides ayant des fonctions antimicrobiennes comme les protéines « bactericidal/permeability-increasing », les lysosymes, les lactoferrines, les défensines, les indolicidines et les cathélicidines (44, 76, 195). Les CAMP sont aussi présents dans les cellules de Paneth. Plusieurs autres types cellulaires synthétisent des CAMP comme les cellules épithéliales et les leucocytes ( $\beta$ -défensines) (95).

#### ***4.2.2 Propriétés des CAMP : structure et composition***

Les CAMP ont une charge nette positive variant entre +2 et +7 due à leur composition riche en arginines et en lysines et sont formés de 12 à 50 acides aminés en moyenne (96). Les CAMP sont des molécules amphipathiques possédant une face hydrophobe, comprenant une chaîne d'acides aminés latérale non-polaire et une face hydrophile de résidus polaires chargés positivement. La plupart des CAMP ont au moins 50% d'acides aminés hydrophobes et une faible proportion de résidus polaires et neutres ou négativement chargés (96).

#### ***4.2.3 Mécanismes d'action et effets sur l'hôte et sur le pathogène***

La nature à la fois cationique et hydrophobe des CAMP est très importante pour les premières interactions avec les membranes : la charge positive promouvoit les interactions avec les membranes cytoplasmiques externes des bactéries, tandis que l'augmentation du moment d'hydrophobicité

(une mesure de l'amphiphilicité d'un segment d'une protéine), engendre une augmentation des liaisons des peptides sur la membrane. La première étape est l'interaction des polycations avec les cations divalents natifs  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  à la surface de la membrane externe. Ceci produit le déplacement compétitif de ces derniers. C'est alors que les CAMP s'accumulent et l'agglomération devient de plus en plus grosse, ce qui provoque des modifications majeures des propriétés normales de la membrane externe, résultant en un accroissement de la perméabilité membranaire. Pendant leur assimilation subséquente dans la ME (« self-promote uptake ») sous l'influence du potentiel électrique important de la membrane cytoplasmique bactérienne, les peptides subissent une transition de forme. Il y a alors agglomération des peptides pour former des pores, les côtés hydrophobes vers la membrane et les côtés hydrophiles vers la lumière du pore. L'intégrité membranaire est alors détruite et la cellule meurt. En plus de la progression des CAMP vers la MI, ceci peut favoriser l'entrée de plusieurs types de molécules à caractère antimicrobien (95). La capacité à former des pores est favorisée par le grand potentiel transmembranaire des bactéries à Gram-négatif en conséquence de la présence d'une grande quantité de lipides chargés négativement et du manque de lipides cationiques et de cholestérol.

#### ***4.2.4 Les LPS et la résistance aux CAMP***

L'encombrement stérique à la surface cellulaire due à la présence des LPS protège les bactéries à Gram-négatif des CAMP. Ce phénomène permet la capture des CAMP et empêche ceux-ci d'atteindre la ME (178). De plus, la présence de  $Mg^{2+}$  atténue fortement l'interaction des CAMP avec les LPS, ce

qui contribue à la résistance des bactéries à Gram-négatif vis-à-vis ces molécules bactéricides (155). Par ailleurs, il a été suggéré que les LPS pourraient agir comme le cholestérol des cellules eucaryotes, en favorisant le compactage des chaînes acyles dans la ME (3). Chez *Brucella abortus*, une mutation dans BvrS /BvrR, un TCS essentiel à la virulence, cause une sous-acylation du lipide A et une augmentation de la fluidité membranaire. Ce phénomène engendre la sensibilité du mutant BvrS /BvrR à la polymyxine B (150).

#### 4.2.4.1 Modifications covalentes de la structure prototype du lipide A

Chez certaines souches de *E. coli* et de *Salmonella*, notamment *S. enterica* Serovar Typhimurium, le lipide A peut être modifié de façon covalente avec des groupements phosphate, phosphoéthanolamine, 4-aminoarabinose et palmitate (88, 90, 190, 251). *S. typhimurium* porte des groupements hydroxyles au sein des chaînes acyles formant le lipide A. La présence de certaines de ces substitutions est associée à une résistance accrue à certains CAMP comme les polymyxines. Des mutants de *Salmonella* et d'*E. coli* K-12 résistants à la polymyxine B contiennent des taux supérieurs de groupements 4-aminoarabinoses (101, 173). Ces groupements diminuent la charge nette négative de la surface de la cellule bactérienne, diminuant ainsi l'affinité des molécules antimicrobiennes cationiques pour celle-ci (252). Il est aussi possible que les pontages croisés au sein des molécules de LPS soient plus nombreux chez des souches possédant un lipide A avec groupement 4-aminoarabinose (Figure 6). Ceci résulterait des interactions électrostatiques entre ce groupement

et d'autres groupements anioniques retrouvés dans les molécules de LPS adjacentes.

#### 4.2.4.2 Régulation des modifications covalentes du lipide A

La régulation des modifications covalentes du lipide A est bien étudiée chez *S. Typhimurium* et *E. coli* (89, 190, 251). Ces modifications sont sous le contrôle des TCS PhoQ/PhoP et PmrA/PmrB. PhoQ/PhoP répond aux variations de concentration de  $Mg^{2+}$  et aux CAMP (10). PmrA/PmrB est activé directement par de hautes concentrations en  $Fe^{3+}$  et en  $Al^{3+}$  ainsi que par une acidité modérée (80, 170, 181).

PhoQ/PhoP contrôle les gènes *pag* (« PhoQ/PhoP activated genes ») et *prg* (« PhoQ/PhoP repressed genes »). PagP est une enzyme de la ME responsable de l'ajout d'une chaîne palmitate sur la molécule de lipide A (Figure 6). PagP utilise les phospholipides du feuillet interne comme substrat (24). Cette enzyme est caractérisée par une activité catalytique dormante dont le signal d'induction n'est pas encore identifié (112). Cependant, des perturbations de la surface bactérienne, suite à un traitement à l'aide d'un chélateur d'ions comme l'EDTA, induisent la palmitoylation du lipide A. La palmitoylation est importante pour la pathogenèse bactérienne. En effet, le lipide A hepta-acyle contribue non seulement à la résistance de *E. coli* vis-à-vis les CAMP, mais aussi à l'atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte *via* la voie de signalisation TLR4 (25). L'ajout de groupements hydroxyles sur les chaînes acyles du lipide A est aussi directement dépendant de l'activité de PhoQ/PhoP.

Le TCS PmrA/PmrB contrôle l'ajout de groupements phosphoéthanolamine (pEtN) et /ou 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-Ara4N) sur le lipide A (Figure 6). Le gène *pmrC* est responsable de la modification pEtN (134), alors que le locus génétique *pmrF* est responsable de la modification L-Ara4N (252). Les substitutions par ces deux molécules peuvent survenir sur les phosphates 1 et 4' de la molécule prototype du lipide A. Cependant, L-Ara4N semble être ajouté préférentiellement en position 4', alors que pEtN est essentiellement observé en position 1. PmrA/PmrB contrôle aussi l'ajout de pEtN dans le noyau des LPS via l'activation du gène *cptA* (243).

Chez *S. Typhimurium*, l'ensemble de ces modifications covalentes peuvent aussi survenir en conséquence de l'activité du TCS PhoQ/PhoP. En effet, ce système contrôle l'expression de PmrD, une protéine navette aiguillonnant le signal d'activation vers le TCS PmrA/PmrB. PmrD agirait comme protéine chaperonne et interagirait avec PmrB-P, inhibant la déphosphorylation de cette dernière (63, 115-117, 127). Chez *Yersinia sp.*, il n'existe pas de protéine navette PmrD. Cependant, pour induire la transcription, PhoP-P lie directement une séquence distincte des boîtes *pmr* sur les promoteurs *pmr* (290). Chez *E. coli*, le TCS PmrA/PmrB (BasR/BasS) n'est pas activé en conséquence de l'induction de PhoQ/PhoP, puisque PmrD est fonctionnellement divergente et que les gènes *pmr* ne possèdent pas de boîtes PhoP-dépendantes (291).



#### **4.2.5 Les CAMP utilisés dans cette étude**

La polymyxine B est un peptide cyclique caractérisé par une queue peptidique linéaire située en N-terminal et qui porte une chaîne acyle (255). Les polymyxines se lient fortement aux groupements anioniques des LPS ainsi qu'à leur lipide A (119, 298). Il en résulte la perturbation de l'organisation de la superstructure des LPS qui compose majoritairement le feuillet externe de la ME. Ceci a pour effet d'augmenter la perméabilité de cette dernière. La cécropine P1 est une hélice  $\alpha$  continue et amphipatique portant un groupement amide en C-terminal sécrétée par les cellules de l'épithélium intestinale porcine (301).

### **4.3 Acidité**

#### **4.3.1 Environnement à pH acide**

*E. coli* doit faire face à des variations de pH, souvent brusques et drastiques, dans l'environnement et chez ses hôtes (21, 85). *E. coli* est très résistante à l'acidité (85, 137). Par exemple, cette bactérie peut être confrontée aux fortes concentrations d'acide gastrique de l'estomac et doit alors faire face à un microenvironnement dans lequel le pH peut s'abaisser jusqu'à une valeur de 1,5 (59). L'intestin grêle, dans lequel le pH s'approche de la neutralité, est un microenvironnement riche en acides faibles, dont les acides gras volatiles provenant de la fermentation (39). Lorsqu'ils se retrouvent sous leurs formes protonés, ceux-ci diffusent à travers les membranes bactériennes en libérant simultanément un proton au cours du processus (74). Le microenvironnement

acide des phagosomes et phagolysosomes à l'intérieur des cellules épithéliales intestinales et des macrophages est aussi un exemple de stress acide auquel certains pathogènes doivent faire face (224). Le stress acide est donc défini par une juxtaposition et une synergie entre le pH et la présence d'acides organiques faibles.

#### ***4.3.2 Les mécanismes de défense contre le stress acide.***

Lorsque le pH interne d'une cellule atteint une valeur de 4,5, les processus physiologiques sont grandement affectés en conséquence de la dénaturation des protéines, de la dépurination de l'ADN et des dommages membranaires (84, 192, 193, 205). Ainsi, la réponse au stress acide doit être rapide et efficace. Les événements de régulation constituant la réponse adéquate de la bactérie dans une situation de stress acide constituent un véritable réseau impliquant différents régulateurs globaux et spécifiques ainsi que différentes voies métaboliques.

L'enveloppe cellulaire est une structure complexe et est le siège d'une multitude de processus biologiques. Elle est la frontière entre la cellule et le milieu externe et doit permettre certains échanges tout en agissant comme une barrière contre différents agresseurs. Les variations de pH affectent grandement les paramètres physiologiques d'une cellule. Ainsi, de simples variations de pH influencent grandement les processus d'import/export, de signalisation et de régulation cellulaire et ce, même si ces éléments ne sont pas impliqués directement dans les mécanismes de réponse au stress acide (175). De plus, les

variations environnementales de pH influencent grandement les propriétés chimiques et physiques de certains ions et de certaines molécules. Par exemple, la solubilité du  $\text{Fe}^{3+}$  diminue en fonction du pH d'une grandeur de l'ordre de  $10^{23}$  de pH 2 à pH 10. Les cellules bactériennes doivent donc répondre adéquatement aux changements physiologiques et environnementaux provoqués par les conditions acides.

#### *4.3.3 Les systèmes de ménage dans le maintien du pH interne.*

Lorsque la variation de pH est inférieure à une limite de deux unités de pH par rapport à l'optimum de croissance de la bactérie, des propriétés intrinsèques à la cellule ainsi que des systèmes constitutifs (non induits de façon spécifique par l'acidité) participent au maintien du pH interne de la cellule, soit entre 7,4 et 7,8 (224). Ce sont les systèmes de ménage. Ces derniers ne sont cependant pas importants lors de chocs acides soudains et intenses (204).

Les membranes bactériennes sont réfractaires au passage des ions  $\text{H}^+$ . Ces derniers pénètrent probablement la cellule *via* des canaux protéiques. Il est aussi probable que les ions  $\text{H}^+$  traversent directement les bicouches lipidiques endommagées (73). Des protéines grandement chargées pourraient avoir à jouer un rôle important dans la survie aux stress acides en agissant comme puits à protons (protéines pouvant être réduites), permettant ainsi l'homéostasie du pH cytosolique. En effet, les constituants cellulaires agissent comme tampon en capturant une partie des ions  $\text{H}^+$  tout en contribuant à la charge positive

intracellulaire (203). De plus, les bactéries possèdent des pompes antiports  $K^+/H^+$  (74) et des systèmes de transport de protons couplés à la synthèse et à l'hydrolyse de l'ATP ( $H^+$  -  $F_0/F_1$  ATPases) qui permettent l'expulsion des protons. L'expulsion de protons est aussi possible par symport avec d'autres solutés. La chaîne de transport d'électrons permet aussi l'efflux protonique (175). L'activité enzymatique des membranes est en partie déterminée par leur composition en acides gras (FA). Par exemple, l'activité des pompes  $F_0/F_1$ -ATPases, qui est importante comme système de ménage contre une diminution du pH extracellulaire, est influencée par la composition membranaire en FA (239)

Un pH acide induit la fermeture des porines, ce qui résulte en une diminution de l'ordre de 20 à 25% de la perméabilité de la ME (139, 249, 294). Les polyamines favorisent la résistance à l'acidité en conséquence de leur influence sur la perméabilité de la ME. En effet, elles bloquent les porines à cations *via* des liaisons polyamines (218). Cette propriété favorise donc la baisse de la perméabilité membranaire envers les protons.

L'acide colanique caractérisant les capsules de groupe 1 favorisent aussi la survie à des stress à l'acidité (151, 152). Par ailleurs, les LPS servent à stabiliser et à maintenir l'intégrité de la ME en favorisant les interactions électrostatiques entre les différentes composantes de la surface bactérienne. Ces interactions peuvent modifier la conformation et les fonctions des protéines de la ME impliquées dans la tolérance à l'acidité (ATR) (74). Les LPS pourraient

agir en tant que barrière physique ou modifier les charges de la surface bactérienne diminuant ainsi la perméabilité de cette dernière aux protons. La chaîne O des LPS et l'antigène commun des Enterobacteriaceae (ECA) sont importants pour la résistance aux acides organiques que l'on peut retrouver dans l'intestin, surtout vis-à-vis les FA à courte chaîne (16). Chez *Rhizobium leguminosarum*, la perte du locus portant les gènes associés à la résistance à l'acidité affecte grandement la structure des LPS et résulte en un phénotype de sensibilité à l'acidité (74).

#### ***4.3.4 La résistance et la tolérance à l'acidité***

La résistance à l'acidité (AR) fait référence à la survie à des pH extrêmes d'une population bactérienne en phase stationnaire de croissance ayant poussée *a priori* à pH neutre (224). La tolérance à l'acidité (ATR) fait généralement référence à la survie d'une population bactérienne ayant poussé à un pH modérément bas, soit environ un pH de 5-6 (224). L'ATR protège les cellules en phase exponentielle pour une période prolongée de plusieurs heures à pH 3 (74).

##### ***4.3.4.1 La phase stationnaire de croissance et l'acidité***

L'AR est la plus grande lors de la phase stationnaire de croissance et peut protéger les cellules pendant plusieurs heures à pH 2. Les cellules en phase stationnaire de croissance sont de 10 à 10 000 fois plus résistantes que les cellules en phase exponentielle de croissance et cela, sans passage à pH modéré *a priori* (160). De façon similaire, des cellules dont la croissance est lente,

démontrent une plus grande ATR que des cellules à croissance rapide. Ceci pourrait suggérer que des composantes de la surface cellulaire sont impliquées aussi dans l'ATR.

#### 4.3.4.2 *La porine PhoE et l'acidité*

La porine PhoE joue un rôle important dans l'ATR chez *E. coli*. À pH acide, les ions  $H^+$  se lieraient à des anions ou à des polyanions, comme les molécules de polyphosphate, pour atteindre l'espace périplasmique de la cellule pour ensuite y être relâchés (210). La présence continue de la porine PhoE chez des mutants *pst* et *phoR* augmente l'ATR tout en diminuant, paradoxalement l'AR (211). À l'inverse, un mutant *phoE* démontre une plus petite capacité d'adaptation et une AR accrue. Dans l'espace périplasmique, il est possible que les  $H^+$  lient une ou des protéines senseuses, qui permettraient la transduction signalétique engageant par le fait même la cellule dans la réponse d'adaptation à l'acidité (211). L'ATP et les polyamines peuvent provoquer l'obstruction des des porines comme PhoE (217). Ainsi, dans certaines conditions, ces molécules peuvent contribuer à la résistance à l'acide lorsque PhoE est exprimée.

#### 4.3.5 *Les acide gras cyclopropanes (CFA) et l'acidité*

Chez *E. coli*, des modifications dans la composition des FA membranaires sont observées lorsque des cultures à pH 7 et à pH 5 sont comparées. Pour les cultures à pH 5, il y a une diminution significative des FA C16 :1  $\omega$ 7c et C18 :  $\omega$ 7c avec une augmentation concomitante des acides gras

cyclopropane (CFA) C17 :0 et C19 :0 et autres FA saturés (28). La quantité de CFA totale passe ainsi d'environ 3% à un maximum mesuré de 22%. Les CFA proviennent d'une modification post-synthétique des doubles liaisons C-C des FA insaturés (UFA) (281). La Cfa synthase catalyse cette réaction par l'addition d'un groupement méthylène provenant du donneur *S*-adénosyl méthionine (47). Le gène *cfa* possède deux promoteurs : P1 et P2. P1 est un promoteur  $\sigma^{70}$ , tandis que P2 dépend de RpoS (47). La formation maximale de CFA se produit lorsqu'une culture bactérienne entre en phase stationnaire de croissance (268). Un mutant isogénique pour le gène *cfa*, codant pour la Cfa synthase, est beaucoup plus sensible à une variation de pH sans adaptation, allant de pH 7 à pH 3. L'incorporation de CFA exogènes engendre une plus grande résistance à l'acidité (40). Par exemple, la résistance à l'acidité de souches normalement sensibles est grandement augmentée par l'addition exogène de CFA C17. Une souche mutante pour *cfa* et ne possédant que le précurseur du C17, soit l'acide palmitoléique (C16 : 1) reste sensible (40). On peut observer le même phénomène par l'addition exogène de CFA C19 en comparaison avec son précurseur C18 :1. Cependant, cet homologue à longue chaîne semble avoir un effet positif de résistance moins grand que le CFA C17. Le modèle le plus probable pour expliquer le rôle des CFA dans la résistance à l'acidité serait que ceux-ci diminueraient grandement la perméabilité membranaire aux protons étant donné que la perméabilité aux protons est inversement proportionnelle à l'épaisseur de la bicouche phospholipidique. La conversion des UFA en CFA aurait pour conséquence d'augmenter l'épaisseur

de la bicouche (40) et de stabiliser les structures de la surface bactérienne (61). Il a aussi été suggéré que l'anneau cyclopropane protégerait de l'attaque chimique par les protons au site d'insaturation (132). Il est aussi possible que ces derniers interagissent avec des protéines membranaires pouvant affecter le flux protonique.

Chez *Streptococcus mutans*, la composition des FA membranaires change en fonction du pH. À pH 7, les FA C14 :0 et C16 : 0 prédominent, alors qu'à pH modérément acide (pH 5), les FA C18 :1 et C20 :1 sont les plus importants en quantité (188). À pH acide, l'apparition de UFA diminue la perméabilité de la bicouche lipidique, ce qui favorise la stabilité de la ME et par le fait même la protection contre les ions  $H^+$  (188). La longueur des chaînes acyles pourrait aussi être importante dans ce phénomène. Quivey et ses collaborateurs (2000) n'ont pas noté de différence significative dans la quantité de CFA chez *S. mutans* ayant évolué dans un milieu à pH 7 ou pH 5 (188).

#### **4.3.6 Le potentiel membranaire ( $\Delta\Psi$ )**

Le potentiel membranaire ( $\Delta\Psi$ ) tient compte de toutes les charges de la cellule (73). Chez *E. coli*, le  $\Delta\Psi$  se situe entre -140 et -180 mV. Lorsque le pH est inférieur à 2,5, le  $\Delta\Psi$  a une valeur nulle en conséquence de la perte de l'intégrité membranaire. Cependant, si le système d'AR glutamate ou arginine est fonctionnel (voir plus bas), le  $\Delta\Psi$  s'inverse pour atteindre l'équilibre (203). Les valeurs du  $\Delta\Psi$  avoisinent alors +30 et +80 mV respectivement. Ce



phénomène protège la cellule des protons de par la répulsion entre la cellule et les protons qui en résulte (73). L'antiporteur ClcA/ClcB, situé dans la MI, permettrait l'expulsion de protons simultanément à l'import d'ions Cl<sup>-</sup> (203), ce qui contrebalancerait partiellement l'augmentation du nombre de charges positives à l'intérieur de la cellule (73).

#### **4.3.7 Le système de résistance à l'acidité dépendant des glutamates décarboxylases**

Lorsque le pH environnemental avoisine 2,5, la valeur du pH interne d'une cellule de *E. coli* est d'environ 5. Il faut donc que les mécanismes de résistance soient efficaces et fonctionnels à ce pH. Chez *E. coli*, il y a trois systèmes principaux d'AR: le système oxydatif (39) et les systèmes à acides aminés décarboxylases arginine et glutamate (74, 136, 137). Le système glutamate décarboxylase (Gad) (103) a de plus été démontré comme ayant un rôle important dans la résistance à l'acidité de pathogènes entériques comme *E. coli*, *Shigella flexneri* et *Listeria monocytogenes* (221). Lorsque les cellules bactériennes croissent en milieu complexe comme le milieu Luria-Bertani (LB), le système Gad contribue de façon prédominante à l'AR (39, 55). Le système Gad protège les cellules contre des chocs acides sous pH 3 (23). Le circuit de régulation du système Gad est très complexe. La régulation de ce système n'est pas traitée ici; voir les références suivantes : (51, 114, 133, 144-146, 153, 254). Ce système requiert l'apport exogène de glutamate pendant un stress acide à pH 2. Il repose principalement sur l'activité de deux glutamates décarboxylases, codées par les gènes *gadA* et *gadB*. Ces décarboxylases sont responsables de

convertir le glutamate intracellulaire en acide  $\gamma$ -amino butyrique (GABA). L'activité antiport de la protéine membranaire GadC est responsable de l'acquisition du glutamate extracellulaire et de l'expulsion simultanée du GABA intracellulaire. Le système est fonctionnel et protecteur à pH 2,5 même si l'un des deux isoformes Gad est manquant, alors qu'à pH 2, GadA et GadB sont nécessaires. La formation d'une molécule GABA par une Gad requiert une molécule de glutamate ainsi qu'un proton et libère une molécule de CO<sub>2</sub>. Il est décrit que le résultat net de la décarboxylation et de l'activité import/export de GadC est une alcalinisation du cytosol. Cependant, en conséquence de la variation de pH de part et d'autre de la membrane cellulaire (224), le glutamate, qui est sous sa forme protonée en milieu acide, libère un H<sup>+</sup> durant le processus d'importation (39). Il semble donc y avoir équilibre entre l'acquisition et l'exportation des protons (74). À cause du paradoxe existant à propos du cycle des protons du système glutamate, il a été suggéré qu'un mécanisme de production de glutamate endogène doit exister. Finalement, d'autres mécanismes moléculaires, qui ne sont pas décrits ici, favorisent aussi la survie à des stress acides. Ceux-ci impliquent des petites molécules signales extracellulaires qui peuvent capter des signaux d'acidité à distance de la cellule bactérienne (206-209).

#### ***4.3.8 Le gène Pho-dépendant *asr* et son rôle dans la réponse au stress acide***

Le gène *asr* (originellement pour « acid shock RNA ») code pour une pré-protéine de 102 acides aminés et de 18 kDa. Ce gène est fortement transcrit

en condition d'acidité environnementale (transcription optimale à pH 4,0 - 4,5). La pré-protéine subit le clivage de sa séquence N-terminale et un second clivage, donnant respectivement naissance à une protéine de 15 kDa (pré-protéine dont la séquence signal est clivée) ainsi qu'à une protéine de 8 kDa. Le produit de 8 kDa, localisé dans l'espace périplasmique, fut démontré comme étant essentiel au phénotype de l'ATR, contribuant à l'acclimatation à des pH très acides. *Asr* supporte la croissance à pH modéré (pH 4,5) et est requise pour l'induction de l'ATR et de la survie subséquente des cellules en phase exponentielle de croissance à pH très acide (pH 2). Des cellules en phase stationnaire de croissance expriment aussi le gène *asr* à pH 4,5-5,0, mais celui-ci n'est pas requis pour la survie de ces cellules lorsqu'elles sont transférées dans un milieu très acide (pH 2,0). *Asr* pourrait agir en séquestrant les protons dans le périplasma ou en agissant comme chaperonne pour protéger les autres protéines de l'acidification. Chez *E. coli*, la protéine HdeA est induite fortement en condition d'acidité et est nécessaire pour une résistance à l'acidité et pour la virulence. HdeA a une activité chaperonne et prévient l'agglomération des protéines dénaturées par l'acidité (75). Tout comme HdeA, *Asr* pourrait s'associer aux protéines dénaturées par l'acidité. Il a de plus été démontré que des conditions limitantes pour le phosphate ne sont pas nécessaires pour l'observation du phénotype *asr*, alors que l'intégrité de PhoR /PhoB est nécessaire (242).

Finalement, une étude effectuée par Tucker *et al.* (2002), a montré que 28 gènes sont certainement régulés à la hausse en condition d'induction de

l'AR glutamate dépendante (253). Plusieurs de ces gènes, dont le régulateur GadE, un régulateur positif du système Gad, sont regroupés sur le chromosome dans la région du gène *gada*. Ces gènes peuvent être divisés en cinq groupes fonctionnels. En effet, les gènes identifiés sont impliqués dans le métabolisme, dans la modification de l'enveloppe cellulaire, comme chaperons et comme régulateurs. Il est donc certain que des composantes de la surface de la bactérie sont impliquées dans l'AR. L'identification du gène *cfa* appuie l'étude de Chan et Cronan (1999) (40). Le petit transcrit *asr* fut aussi identifié.

## **5. Les souches d'*Escherichia coli* pathogènes causant des maladies extra-intestinales : les ExPEC.**

Les souches d'*E. coli* pathogènes causant des maladies extra-intestinales sont nommées conceptuellement les ExPEC (« **Ex**traintestinal **P**athogenic *Escherichia coli* ») (216). Les mécanismes de virulence par lesquels les souches ExPEC causent les maladies extra-intestinales, comme par exemple la méningite, les infections du tractus urinaire (UTI) et la septicémie, font l'objet d'études approfondies puisqu'elles sont la cause de problèmes de santé publique et de pertes économiques appréciables pour les fermes d'élevage. Ces mécanismes participent à la capacité du pathogène à coloniser la muqueuse intestinale, à envahir les tissus extra-intestinaux et à survivre aux multiples stress pouvant être rencontrés à l'intérieur de l'hôte. Par exemple, ces souches doivent être aptes à survivre à l'effet bactéricide du complément et des CAMP, à échapper ou à résister aux différentes cellules du système immunitaire, à

survivre et à se multiplier dans des environnements hostiles comme l'estomac et les vacuoles endosomales, à l'intérieur desquelles les pH sont extrêmes, de même que dans le sang, où les concentrations en fer disponible sont très faibles.

### **5.1 Les facteurs de virulence associés aux ExPEC**

Plusieurs facteurs de virulence (FV) sont associés à la capacité à causer des infections extra-intestinales (69, 98) parmi lesquels figurent certains antigènes O (O18, O78, O11 et O115) et antigènes capsulaires (K1 et K5), différents fimbriae et autres adhésines de surface (P, F1, F17, X, S, AfaVIII, Eae, 31A, curli) et différentes cytotoxines (hémolysine, Vir et les colicines). Le plasmide ColV des souches ExPEC potentialise la virulence (278). Le plasmide ColV porte plusieurs de ces gènes de virulence. Par exemple, le système du sidérophore aérobactine pour la séquestration du fer, les gènes *iss* et/ou *traT* impliqués dans la résistance à l'effet bactéricide du sérum et à la phagocytose, de même que certains gènes impliqués dans la motilité, peuvent être portés par des plasmides de type ColV (129, 157, 171, 238).

### **5.2 Les souches ExPEC aviaires ou APEC (« Avian Pathogenic *E. coli* »)**

#### **5.2.1 Étiologie des APEC**

L'industrie de la volaille subit annuellement d'importantes pertes économiques suite à la morbidité et la mortalité causée par des souches d'*E. coli* pathogènes aviaires (APEC; Avian Pathogenic *E. coli*). Les voies respiratoires, soit les sacs aériens, sont la voie d'entrée principale des APEC chez la volaille. Aussi, les infections par les APEC peuvent être causées par la

transmission à l'œuf par des parents infectés ou par la contamination fécale de la surface de l'œuf et pénétration subséquente de la bactérie à travers la coquille. Environ 0,5-0,6% des œufs contiennent *E. coli*, entraînant ainsi une grande mortalité des poussins (129). Une grande densité d'individus dans un poulailler, une mauvaise aération (pour l'évacuation de l'ammoniaque) et un taux d'humidité trop faible favorisent le stress des individus et la dissémination des pathogènes à travers le groupe *via* la présence d'aérosols et de poussières (157). De plus, la coprophagie et les infections causées par d'autres micro-organismes (*Mycoplasma* spp., le virus de la maladie de Newcastle et le virus de la bronchite infectieuse aviaire) potentialisent les colibacilloses (87). La synergie de tous ces facteurs favorise donc les infections aux APEC (129).

### 5.2.2 *L'infection aux APEC*

Les infections aux APEC sont caractérisées par une déficience respiratoire chez les jeunes poulets de 3 à 12 semaines, la plupart du temps suivie d'une infection plus généralisée. Les APEC adhèrent aux cellules épithéliales du pharynx, de la trachée et des sacs aériens *via* les fimbriae de type 1 (62, 128, 129, 157). La présence des fimbriae de type 1 favorise aussi la colonisation intestinale et est associée à une plus grande fréquence de transmission fécale-orale (62). Les fimbriae de type P permet lui aussi la colonisation des poumons (mais pas de la trachée) et des sacs aériens. Celui-ci est aussi important dans la pathogénie des APEC, puisqu'il permet la colonisation des organes internes (157). Pour sa part, les fimbriae de type 1 ne sont pas exprimés lorsque les bactéries colonisent les tissus profonds ou

lorsqu'elles se retrouvent dans le sang. Les APEC sont souvent associées ou localisées à l'intérieur des macrophages durant les étapes précoces de l'infection dans les sacs aériens et les poumons (157). Ceci pourrait favoriser leur dissémination dans l'organisme.

### 5.2.3 La souche APEC $\chi$ 7122

La souche APEC  $\chi$ 7122 cause des infections au niveau des voies respiratoires (aérosacculites) ainsi que la septicémie chez le poulet. Cette souche est responsable de plusieurs maladies extra-intestinales comme les péricardites et les périhépatites.  $\chi$ 7122 est de sérotype O78, possède une capsule K80 et un antigène flagellaire H9. Les souches APEC O78 appartiennent à un nombre restreint de groupes clonaux et peuvent être des agents de zoonose (42, 283, 284). Cette souche possède plusieurs gènes de virulence associés aux ExPEC (Tableau II). Par exemple, Tsh (temperature-sensitive hemagglutinin), un facteur d'agglutination des érythrocytes du poulet, est responsable de lésions dues au dépôt de fibrines dans les sacs aériens pendant la période précoce de l'infection (58). L'expression du gène *tsh* est augmentée dans les sacs aériens de la volaille tel que démontré par capture sélective des séquences transcrites (SCOTS). Des gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS, dans le transport du fer, dans la réplication et la conjugaison plasmidique et *phoB* ont aussi été identifiés (57). Le locus *rfb*, qui code pour des gènes de biosynthèse des LPS, est aussi nécessaire pour la

**Tableau II : Gènes de virulence de 5131 et  $\chi$ 7122 identifiés par puce à ADN<sup>a</sup>**

Gènes	Fonctions
<b>Gènes communs à 5131 et <math>\chi</math>7122</b>	
<i>artJ</i>	Gène d'urovirulence putatif : protéine du périplasme liant l'arginine
<i>b1121</i>	Facteur de virulence putatif
<i>csgE</i>	Chaperonne des curli
<i>fimA</i>	Sous-unité majeure des fimbriae de type I (ou F1)
<i>fimH</i>	Adhésine des fimbriae de type I
<i>fliC</i>	Sous-unité flagellaire majeure (flagelline)
<i>gad</i>	Glutamate décarboxylase
<i>hlyE</i>	Hémolysine E
<i>ibeB</i>	Protéine d'invasion des cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales (BMEC)
<i>iucD</i>	N-6-hydroxyllysine (« L-lysine-6-monooxygenase ») appartenant à l'operon aérobactine
<i>iutA</i>	Récepteur de la cloacine DF13 (aérobactine)
<i>lpfA</i>	LpfA (« long polar fimbriae »)
<i>mviM</i>	Facteur de virulence putatif
<i>mviN</i>	Facteur de virulence putatif
<i>ompA</i>	Protéine de la membrane externe OmpA
<i>ompT</i>	Protéine de membrane externe 3b ou protéase VII (également appelée omptin ou protéase A)
<i>tnaA</i>	Tryptophanase
<i>traT</i>	Protéine de résistance au complément
<b>Gènes uniques à 5131</b>	
<i>agn43</i>	Antigène 43, adhésine qui confère des capacités d'agrégation entre les cellules
<i>cia</i>	Gène structural de la colicine Ia
<i>fooA</i>	Sous-unité majeure des fimbriae F165 <sub>1</sub>
<i>mchB</i>	Gène structural de la microcine H47 (classe II)
<i>paa</i>	Protéine associée aux effets d'attachement et d'effacement des microvillosités intestinales
<i>papA(11)</i>	Sous-unité fimbriale majeure des pili P
<i>papC</i>	Protéine « usher » des pili P
<i>papGIII</i>	Adhésine des pili P (allèle III)
<i>tem</i>	Gène de résistance aux $\beta$ -lactamines (ampicilline)
<i>tet(B)</i>	Gène de résistance à la tétracycline
<b>Gènes uniques à <math>\chi</math>7122</b>	
<i>ant(3)-Ia</i>	Gène de résistance à la streptomycine et la spectinomycine
<i>cvaC</i>	Gène structural de la microcine V (classe II)
<i>F17b-A</i>	Sous-unité majeure des pili F17b
<i>int 1</i>	Intégron de classe I
<i>iroN</i>	Récepteur de sidérophore
<i>iss</i>	Gène de résistance à l'effet bactéricide du sérum (« Serum survival and surface exclusion protein ») qui est homologue au gène <i>bor</i> du phage $\lambda$
<i>sulI</i>	Gène de résistance aux Sulfonamides
<i>tsh</i>	Hémoglobine protéase (« Temperature sensitive hemagglutinin »)

<sup>a</sup>Résultats non publiés. Cette puce à ADN contient 189 gènes ou marqueurs de virulence et 30 gènes de résistance aux antibiotiques. Il s'agit d'un outil de diagnostic pour identifier différents pathotypes d'*E. coli*. Voir Bruant *et al.* (2006). Hybridation et lecture des puces effectuée par Guillaume Bruant.



virulence de la souche  $\chi$ 7122 (30). En effet, l'antigène O78 des LPS augmente la résistance au sérum et le pouvoir de colonisation des organes internes. Chez la souche  $\chi$ 7122, il a été démontré que l'antigène O et la région O-min, une région génétique non-caractérisée putative pour un ou des FV, protègent la bactérie contre l'action bactéricide des cellules phagocytaires, surtout des hétérophiles (157).  $\chi$ 7122 s'associe faiblement aux cellules phagocytaires même lorsqu'elle est opsonisée. L'accessibilité de l'opsonine à la surface bactérienne et la fixation du complément semblent dépendantes de la présence et de la composition des LPS (157). Chez  $\chi$ 7122, le plasmide pAPEC-1, qui est associé à la virulence, porte les gènes impliqués dans la pathogénie affectant les voies aériennes inférieures et les tissus extra-respiratoires lors d'infections *in vivo* chez le poulet (58). Par exemple, pAPEC-1 porte *iss*, un gène normalement associé à la résistance au sérum. Les systèmes Iro et aérobactine sont aussi encodés sur pAPEC-1 et sont tous deux impliqués dans l'acquisition du fer dans les tissus extra-intestinaux (57).

### **5.3 La souche ExPEC porcine non-entérotoxigène 5131 de sérogroupe O115.**

Les souches O115 : K«V165» peuvent être séparées en deux sous-groupes, soit les souches d'*E. coli* entérotoxigènes (ETEC) et les souches non-entérotoxigènes. Les souches O115 : K«V165» non-entérotoxigènes possèdent les fimbriae F165 (54). Les souches O115 : K«V165» : F165 colonisent l'iléon et causent la septicémie chez des porcelets post-sevrage (69). 5131 est une souche O115 : K«V165» : H51 : F165 et fut isolée à partir du

contenu intestinal de porcs ayant la diarrhée à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal (Québec, Canada) (69, 166). Elle possède aussi plusieurs gènes associés aux ExPEC dont plusieurs sont en commun avec la souche APEC  $\chi$ 7122 (Tableau II). La transmission d'ExPEC entre les porcs s'effectue par la voie fécale-orale. La morbidité causée par ces souches d'*E. coli* cause des pertes économiques importantes dans l'industrie porcine. L'étude de Fairbrother *et al.* (1989) a démontré une forte corrélation entre la capacité des souches d'*E. coli* O115 : K«V165» à résister à l'effet bactéricide du sérum de lapin et la mortalité qu'elles engendrent chez la souris adulte (69). La résistance à l'effet bactéricide du complément est donc un attribut important de la virulence de la souche ExPEC 5131.

#### **5.4 La capsule des souches ExPEC 5131 et $\chi$ 7122**

Les souches d'*E. coli* O78 et O115 sont considérées en sérologie comme étant K négative (176, 177). Cependant, elles synthétisent des polysaccharides capsulaires de type « O-like » (228). Ceux-ci consistent en une seconde chaîne O, plus longue, masquant celle des LPS. Il a de plus été démontré que ces capsules contribuent à la résistance à l'effet bactéricide du complément et à la pathogénicité. La capsule de 5131 ne comporte pas de composante protéique majeure, possède une faible charge négative, est faiblement immunogénique et est antigéniquement différente des antigènes O115 des LPS (166). Cette capsule présente quelques similarités avec la capsule « O-like » ( $K_{LPS}$ ) des souches O111 (83). La CPS des souches O111 a une charge nette neutre et inhibe la

réaction d'agglutination de cellules traitées avec des anticorps anti-O111. Le polysaccharide capsulaire  $K_{LPS}$  interagirait avec les chaînes O des LPS et masquerait ainsi les déterminants antigéniques de ceux-ci (166). La CPS de  $\chi 7122$  est similaire à celle de 5131 (42). La souche  $\chi 7122$  possède aussi les gènes impliqués dans la biosynthèse d'une capsule du groupe 2 (30, 264). Cependant, ceux-ci sont silencieux.

## 6. Le projet de recherche

### 6.1 Problématique et contexte scientifique

La présente étude s'intéresse au régulon Pho, plus particulièrement à son implication dans la virulence des souches d'*E. coli* pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son contrôle dans la modulation de certaines structures de la surface bactérienne. Les souches ExPEC 5131 et  $\chi 7122$  causent la septicémie chez le porc et la volaille respectivement. Les pathogroupes auxquels appartiennent ces souches sont la cause d'un taux important de morbidité et de mortalité chez les animaux d'élevage et par conséquent, de pertes économiques importantes pour l'industrie agroalimentaire. Notre laboratoire a identifié par mutagenèse par transposon (*TnphoA*), un locus génétique important pour la virulence de la souche ExPEC 5131. Le transposon fut localisé dans le gène *pstC* de l'opéron *pstSCAB-PhoU*, qui code pour un système (Pst) impliqué dans le transport spécifique du phosphate inorganique ( $P_i$ ). Cet opéron est sous la gouverne du système à deux composantes (TCS) PhoR/PhoB. Une mutation dans Pst induit l'activation

continue du régulon Pho. De plus, depuis quelques années, plusieurs études ont établi des liens de corrélation entre Pst, le régulon Pho et la virulence et ce, chez différentes espèces bactériennes. Cependant, dans tous les cas, la relation entre le régulon Pho et la virulence a une base moléculaire inconnue. Notre laboratoire s'intéresse donc à résoudre ce problème.

## 6.2 Hypothèse de travail

Avant le début de mes travaux de doctorat, notre laboratoire ainsi que les autres laboratoires du Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP) avaient cumulé plusieurs données de caractérisation du mutant *pst TnphoA* (le mutant 2 ou M2) de la souche 5131 (99). Ce mutant est sensible à l'effet bactéricide du sérum de lapin (166) et est avirulent dans des modèles expérimentaux d'infection de porcelets et de jeunes poulets (49, 166). M2 est capable de coloniser les muqueuses intestinales, de traverser l'épithélium intestinal et de se localiser dans les nœuds mésentériques lymphatiques, mais est incapable de persister dans les autres organes extra-intestinaux. De plus, ce mutant perd certaines adhésines fimbriaires dû aux problèmes au niveau de l'ancrage plutôt que de l'expression génique.

Dans l'hôte, les souches ExPEC doivent résister à plusieurs facteurs bactéricides comme les molécules du complément, les peptides cationiques antimicrobiens, les protons, etc. Les différentes structures retrouvées à la surface d'*E. coli* forment une véritable muraille contre ces facteurs antimicrobiens. Ainsi, puisque nous savons qu'une mutation dans *pst* cause

l'augmentation de la sensibilité au sérum et engendre l'avirulence d'une souche ExPEC, nous avons fait l'hypothèse de travail suivante : **une mutation dans *pst* provoque d'autres changements au niveau de la composition des structures de la surface bactérienne.**

### 6.3 Objectifs de travail.

Cette hypothèse est véritablement l'élément conducteur du présent travail. En effet, elle a permis d'établir clairement les objectifs à atteindre, afin de combler certains manquements dans l'état des connaissances actuelles concernant la compréhension des effets d'une mutation dans *pst*. Ainsi, mes travaux de doctorat avaient pour but de caractériser les effets de la mutation *pst*. Mes objectifs étaient de : 1) déterminer si la mutation *pst* contribue à d'autres phénotypes; 2) déterminer si la mutation *pst* affecte les souches ExPEC de façon similaire et 3) déterminer quels effets causés par une mutation dans *pst* peuvent être associés à la perte de virulence.

### 6.4 Esquisse de l'étude

Les souches ExPEC 5131 et  $\chi$ 7122 sont utilisées dans notre laboratoire comme systèmes modèles pour l'étude de l'influence du régulon Pho sur la pathogénie d'*E. coli*. Certaines des conclusions qui en découlent dépassent le modèle ExPEC et s'appliquent à d'autres espèces bactériennes. Dans le but de répondre aux objectifs et de vérifier notre hypothèse, nous avons conduit différents tests *in vitro* pour évaluer la résistance des souches ExPEC et de leurs

mutants *pst* dérivés vis-à-vis différents stress auxquels la bactérie est soumise chez l'hôte. En effet, la résistance au sérum, aux CAMP et à l'acidité est associée à des traits de virulence bactérienne et fut évaluée chez les mutants *pst*. Nos résultats indiquent que la modification de certaines structures de la surface bactérienne pouvait être impliquées dans la résistance à ces mêmes stress. Les techniques moléculaires (constructions génétiques, électrophorèse, immunobuvardage, chromatographie en phase gazeuse et en couche mince, spectrométrie, transcriptomique comparative, etc) ont été utilisées pour la caractérisation des structures de la surface bactérienne. Ceci a permis d'identifier des différences structurales entre les souches ExPEC et leurs mutants *pst* dérivés. Finalement, nous avons pu établir une corrélation entre nos résultats, soit de nouveaux phénotypes caractérisant les mutants *pst*, et la virulence bactérienne.

La recherche fondamentale est à la base du développement appliqué. Ainsi, j'espère que cette recherche pourra ouvrir de nouvelles voies d'exploration et stimuler la recherche sur d'éventuels traitements thérapeutiques qui permettraient à leur tour de mettre en échec certains pathogènes. En effet, il est important de minimiser les pertes économiques liées à l'industrie porcine et de la volaille, mais aussi de limiter l'émergence de souches de plus en plus pathogènes incluant les souches ayant des résistances multiples aux antibiotiques, une problématique très importante en santé humaine. Dans cette optique, il est important de souligner que les souches ExPEC à l'étude ont aussi un potentiel comme agent de zoonose.

**MÉTHODOLOGIE ET  
RÉSULTATS**

**ARTICLE 1****Inactivation of the Pst System Reduces the Virulence of  
an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 strain**

Martin G. Lamarche, Charles M. Dozois, France Daigle, Mélissa Caza, Roy

Curtiss III, J. Daniel Dubreuil, and Josée Harel

Manuscrit publié dans *Infection and Immunity*

July 2005. Vol. 73, No 7. p.4138-4145



**Inactivation of the Pst System Reduces the Virulence of an Avian Pathogenic *Escherichia coli* O78 strain**

**Running title:** Reduced virulence of Pst mutants

Martin G. Lamarche<sup>1</sup>, Charles M. Dozois<sup>2</sup>, France Daigle<sup>3</sup>, Mélissa Caza<sup>2</sup>, Roy Curtiss III<sup>4</sup>, J. Daniel Dubreuil<sup>1</sup>, Josée Harel<sup>1\*</sup>

(1) Groupe 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, (2) INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V-1B7 (3) Département de microbiologie, Université de Montréal, C.P. 6128 succursale Centre-ville, Montréal, Canada H3C 3J7 (4) Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri 63130.

\*Author for correspondence: Josée Harel

Telephone: (450) 773 8521ext 8233

Fax: (450) 778 8108

e-mail: [josee.harel@umontreal.ca](mailto:josee.harel@umontreal.ca)

## SUMMARY

*Escherichia coli* O78 strains are frequently associated with extra-intestinal diseases, such as airsacculitis and septicemia, in poultry, livestock, and humans. To understand the influence of the *pst* operon in the virulence of *E. coli*, mutations of *pst* genes, were introduced into avian pathogenic *E. coli* (APEC) O78:K80 strain  $\chi$ 7122 by allelic exchange. Mutation of *pst* genes leads to constitutive expression of the Pho regulon. Further, the virulence of APEC strain  $\chi$ 7122 in a chicken infection model is attenuated by inactivation of the Pst system. The *pst* mutant caused significantly less extra-intestinal lesions in infected chickens, and bacterial numbers isolated from different tissues after infection were significantly lower for the mutant than for the wild-type strain. Moreover, resistance to the bactericidal effects of rabbit serum and acid shock were impaired in the *pst* mutant in contrast to the wild-type strain. In addition, the minimum inhibitory concentration of polymyxin was two-fold less for the mutant than for the wild-type strain. Although the *pst* mutant demonstrated increased susceptibility to rabbit serum, this strain was not killed by chicken serum, suggesting differences in host innate immune defences and complement-mediated killing. In APEC O78 strain  $\chi$ 7122 a functional Pst system is required for full virulence and resistance to acid shock and polymyxin. Our results suggest that mutation of *pst* genes induces deregulation of phosphate sensing, and changes in cell surface composition that lead to decreased virulence indicating the importance of the Pst system for the virulence of *E. coli* pathogenic strains from different hosts.

## INTRODUCTION

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) are a frequent cause of extra-intestinal infections, collectively called colibacillosis, in poultry. Each year, the poultry industry absorbs important financial losses due to high morbidity and mortality caused by APEC. The housing conditions and co-infections by other microorganisms are major physical and biological risk factors that predispose poultry to colibacillosis. Most infections occur *via* aerosol transmission and colonization of air sacs (4). *E. coli* causing extra-intestinal diseases have been termed extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (44). APEC O78:K80:H9 strain  $\chi$ 7122 possesses several ExPEC-associated attributes which are involved in disease development such as septicemia, perihepatitis and pericarditis and belongs to one of the most prevalent serogroups that cause avian colibacillosis (48). *E. coli* O78 strains can also cause diseases in hosts other than poultry, such as swine, sheep, and humans (2, 21). Research conducted on *E. coli* O78 strains from different hosts revealed that pathogenic strains are clonally related. Moreover, this phenomenon is host independent. Therefore pathogenic O78 strains from animal origin represent a high risk of zoonotic infections (1, 11, 63, 64).

The ability to sense microenvironments encountered within the host is an essential virulence property of bacterial pathogens (35). Sensing is followed by the coordination of virulence factor expression, promoting bacterial survival and replication (24, 28). In *E. coli*, the expression of many proteins is induced

by growth in limiting conditions. For example, the expression of the Pho regulon is activated during growth conditions of phosphate limitation, whereas its expression is inhibited when phosphate is in excess (60). The Pho regulon is controlled by the two-component regulatory system, PhoB/PhoR, that responds to phosphate concentration. The PhoR sensor protein located in the inner membrane transmits a signal by phosphorylating the response regulator protein PhoB, which in turn activates transcription by binding to the "Pho box" sequence of the targeted promoters. The PhoBR two-component regulatory system controls the expression of several genes, and currently at least 39 genes have been identified (7, 30). The Pho regulon could possibly include as many as 137 proteins (56). The specific phosphate transport system (Pst) belongs to the Pho regulon and is encoded by the *pstSCAB-phoU* (*pst*) operon. This system consists of a periplasmic P<sub>i</sub> binding protein (PstS), two trans-membrane proteins (PstA, PstC), an ATP binding protein (PstB) and PhoU (42, 49). The two trans-membrane proteins and PstB mediate the uptake of phosphate from the outside to the inside of the cell, whereas the function of PhoU is not clear. PhoU probably plays a regulatory role in the negative control of the Pho regulon and is required to repress the Pho regulon in high phosphate conditions (61). Interestingly, the Pst transport system itself appears to be directly involved in the regulatory cascade and might serve as the primary sensor for the extracellular phosphate concentration (59). An intact Pst system and the PhoR protein are necessary for Pho regulon repression, as constitutive expression of the Pho regulon, including *phoA*, was observed when genes of the *pst-phoU*

operon and the *phoR* gene were mutated (62). In phosphate replete conditions, PhoB activation is blocked in a PhoR and PhoU dependant manner (23, 46, 47).

A number of reports have described an association between the Pst system, the Pho regulon and bacterial virulence (6, 12, 18, 34, 58). Using a technique that selectively captures unique transcripts (Selective Capture Of Transcribed Sequences (13, 22)), PhoB of APEC strain  $\chi$ 7122 was reported to be expressed during infection (14). Moreover, other Pho regulated genes were also shown to be expressed *in vivo* by ExPEC strains (3, 29) . Inactivation of the *pst* operon in a porcine ExPEC strain resulted in constitutive expression of the Pho regulon, and rendered the strain avirulent. APEC strain  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) (39) shares many virulence attributes with the porcine ExPEC strain, including the ability to persist systemically and resist serum (12, 15). Although inactivation of *pst* has been shown to affect the virulence of a number of bacterial pathogens, the mechanisms underlying this attenuation have not been elucidated. One hypothesis to explain decreased virulence due to abrogation of the Pst system is that inactivation of *pst* genes causes an alteration in bacterial cell surface composition.

In this paper, we generated a  $\Delta$ *pst* mutant of APEC strain  $\chi$ 7122 and demonstrate that abrogation of the Pst system influences multiple virulence attributes associated with the cell surface composition. Moreover, we demonstrate that deletion of *pst* genes significantly reduces the virulence of

APEC strain  $\chi$ 7122. These results extend the importance of the Pst system for the virulence of pathogenic *E. coli* belonging to different serogroups, and which are pathogenic for different animal hosts.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids and media.** *E. coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. In general, bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C. LB is a high phosphate containing medium. Low P<sub>i</sub> (LP) broth was used for alkaline phosphatase assay and RT-PCR experiments (LP: 50 mM tris HCl (pH 7,4); 10mM KCl; 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,1% yeast extract; 20 mM glucose and 1 mM methionine.). For experimental infection of chickens, beef heart infusion (BHI) broth and MacConkey-lactose agar plates were used. Antibiotics or supplements were used at the following final concentrations when required: ampicillin (Amp) 100 µg/ml, chloramphenicol (Cm) 12.5 µg/ml, kanamycin (Kan) 50 µg/ml, nalidixic acid (Nal) 40 µg/ml, streptomycin (Sm) 100 µg/ml, and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (XP) 40 µg/ml.

**Generation of a *pst* mutant by allelic exchange.** *E. coli* strain XL1-Blue was used for cloning experiments. A 2914 bp PCR fragment containing the *pstSCAB* genes was amplified from strain  $\chi$ 7122 (41) with the PstF (CTGCCGGATAGTGTAGT) and PstBrev (CATCATGTCCGTGCTCC) primers, and was cloned into pCR2.1 vector using the Original TA Cloning kit

(Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A deletion ( $\Delta pstCAB$ ) in the *pst* operon was obtained by removing an internal *EcoRV* fragment. A kanamycin resistance cassette, *HincII* fragment from pUC71K (40, 57), was then ligated to the *EcoRV* site resulting in  $\Delta pstCAB::kan$ . The construct was digested with *XbaI* and *BamHI* and the  $\Delta pstCAB::kan$  fragment was ligated to the pKNG101 suicide vector (27) cut with the same enzymes. The resulting construct, pKNG800K, was transferred to strain SM10 $\lambda pir$  (37), and was then mobilized into  $\chi 7122$  by conjugation. Single-crossover integrants of strain  $\chi 7122$  were selected on M9 agar containing the appropriate antibiotics (Amp, Kan, and Sm). Selection for double-crossover allele replacement was obtained by *sacB* counterselection on LB agar plates without NaCl, containing 5% sucrose (27) and XP. A  $\chi 7122$  derivative, strain K3, was confirmed to contain a deletion in the *pst* operon as determined by PCR amplification and Southern blot hybridization (data not shown). The pAN92 plasmid (26) carrying the functional *pst* operon was used to complement the  $\Delta pstCAB::kan$  mutant K3 and wild-type parent strain  $\chi 7122$  to create strains CK3 and  $\chi 7122$  (pAN92) respectively. The pAN92 plasmid is a derivative of the medium copy pACYC184 plasmid.

**Alkaline phosphatase assay.** Alkaline phosphatase was measured as described previously (12, 52, 61). Briefly, cells grown in different conditions were adjusted to an OD<sub>600</sub> of 1.0 and 4  $\mu\text{g/ml}$  of XP were added to cells permeabilized by a 50  $\mu\text{l}$  of 1% SDS and 50  $\mu\text{l}$  of chloroform. Development of

color was monitored at 420 nm, and PhoA activity was expressed in enzyme units per minute  $1000 \times [\text{OD}_{420} - (1,75 \times \text{OD}_{550})] / T(\text{min}) \times V(\text{ml}) \times \text{OD}_{600}$ .

**RNA isolation and RT-PCR.** Strains were grown in high phosphate (LB) or low phosphate (LP) medium and were harvested during the mid-log growth phase. RNeasy Mini Kit from QIAGEN was used for the isolation of total RNA from bacteria. Quantification of the total amount of RNA was achieved by spectrophotometry. QIAGEN OneStep RT-PCR kit was used for the RT-PCR study and 1  $\mu\text{g}$  of RNA template was used in each reaction. Two primer pairs were used to target *pstA* and *phoB* expression. The *rpsL* gene was used as a housekeeping control. The reverse transcription reaction was achieved at 50°C for 30 minutes. The DNA polymerase (HotStartTaq™) was then activated at 95°C for 15 minutes as indicated by the manufacturer. For each sample, 25 cycles of PCR amplification was achieved with the different primer pairs. The annealing temperatures used were 67°C, 62°C and 65°C for the *pstA*, *phoB* and *rpsL* primer pairs respectively. The sequences of the *pstA* forward and reverse primers were 5'-CAAACCACTGCGGCGCTGGCTGAATCTCG-3' and 5'-GTGCTCCATCTGCGCCACCAC-AATGGTG-3' respectively. The sequences of the *phoB* forward and reverse primers were 5'-CGTATTCTGGTCGTAGAAGATGAAGCTC-3' and 5'-CACGGTCTGCACCATGCGGTCA-3' respectively. The sequences of the *rpsL* forward and reverse primers were 5'-



GTAAACCAGCTGGTACGCAAACCACGTGC-3' and 5'-  
GGACGCTTCACGCCATACT-TGGAACGAG-3' respectively.

**Experimental infection of chickens via the air sacs.** Three groups of five 3-week-old white leghorn specific-pathogen-free chickens (SPAFAS farms) were reared in separate horsfall isolator cages with food and water available *ad libitum*. Each group of chickens was inoculated in the right thoracic air sac with 0.1 ml ( $10^7$  CFU) of a bacterial inoculum consisting of a diluted 24h beef heart infusion broth culture of either *E. coli*  $\chi 7122$ , the *pst* mutant, or the complemented strain. Blood samples were collected aseptically from each chicken 6, 24, and 48 h following bacterial inoculation and were plated directly or diluted 1:4 in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and 0.1 ml was plated on MacConkey-lactose agar plates (Difco) supplemented with nalidixic acid ( $40 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ) and appropriate antibiotics in the case of the *E. coli* *pst* mutant and complemented strains. All birds were euthanized at 48 h post-infection and necropsied. Macroscopic lesion scores for the air sacs, and combined lesions of the internal organs (heart/pericardium and liver) were marked based on a scheme similar to that used by Melatta *et al.* (2003) (36). Lesions for the caudal thoracic air sacs were scored from 0-4 each for the left and right air sac based on the following criteria: 0, no lesions (normal); 1, slight opacity/edema; 2, mild diffuse thickening and fibrinous exudate, mild neovascularization; 3, moderate fibrinous exudate, opacity, and thickening of membrane, and neovascularization; 4, severe extensive fibrinous exudate,

opacity, and neovascularization of the air sac. The mean score value for the left and right air sacs was then used as the combined air sac lesion score for each individual. The maximal possible lesion score for the air sacs of an individual chicken was therefore 4. Combined lesion scores for pericarditis and perihepatitis were based on the following criteria. Heart and pericardium: 0, normal; 1, vascularization, opacity, cloudy pericardial fluid, 2, Acute pericarditis (extensive fibrinous exudate covering pericardium). Liver: 0, normal; 1 slight fibrinous exudate or decoloration of lobes; 2, severe perihepatitis (extensive fibrinous exudate). The values for lesions of the heart-pericardium and liver were then added for each individual giving a maximal possible combined individual score of 4 for lesions of the heart/pericardium and liver. The mean lesions  $\pm$  standard deviation in either the air sacs or internal organs from individuals belonging to each of the infection groups was used for statistical analyses between groups. Organs were aseptically removed. The left lung, liver, and spleen were weighed, suspended in PBS, and homogenized with an omnimixer homogeniser. Dilutions of homogenates were plated onto MacConkey-lactose agar plates with appropriate antibiotics for bacterial quantification. Several randomly selected colonies per organ were verified by serotyping using O78-specific antiserum.

**Serum bactericidal assay.** The serum bactericidal assay was adapted from Taylor and Kroll (1983) (51). Briefly, bacteria were grown overnight in LB broth at 37°C. Bacterial cultures were then resuspended in fresh medium at a

10-fold dilution, incubated at 37°C, and harvested in the logarithmic growth phase. Bacteria were washed at room temperature with Gelatin-Veronal-Buffered saline pH 7.35 (GVB++) and resuspended to a concentration of  $10^7$  CFU/ml. A volume of 0.1 ml of the bacterial suspension was added to 0.9 ml of normal rabbit serum or chicken serum and incubated at 37°C. Viable cell counts were estimated at 0, 1, 2 and 3 h by spreading out dilutions of the suspension on LB agar plates. A strain was considered resistant if the bacterial count increased or did not change, intermediate if a decrease in the bacterial count of up to 2 orders of magnitude was observed, and serum-sensitive if a decrease of more than 2 orders of magnitude in the bacterial count was observed. The survival rate was calculated as the CFU determined at each time point over the initial CFU present at time zero.

**Polymyxin assay.** Strains were grown overnight and cultures were diluted in fresh LB medium to obtain exponential growth rate cultures ( $OD_{600}=0.7$ ). Cultures were then diluted to obtain  $10^6$  CFU/ml. Microwell plates were loaded with 90  $\mu$ l of the  $10^6$  CFU/ml cultures and 10  $\mu$ l of polymyxin at different concentrations were added to each well to obtain final concentrations of polymyxin between 0.5  $\mu$ g/ml and 2.5  $\mu$ g/ml. Plates were incubated overnight and bacterial growth in wells was evaluated for growth by spectrophotometry. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was considered the lowest drug concentration that reduced growth by more than 50% compared with growth in the control well (19).

**Lipopolysaccharide (LPS) analysis.** Two milligrams of whole bacterial cells were solubilized in Laemmli buffer (32), boiled and treated one hour with proteinase K (0.5 mg/ml) at 60°C. Proteinase K was then inactivated by boiling samples for 2 minutes (25). Classical SDS-PAGE or Tricine SDS-PAGE (33) were used for the LPS analysis. A volume of 10 µl of each sample were added to each well. Silver staining was used to reveal LPS bands (54). Western blot analysis was performed using standard procedure (53). Briefly, LPS bands were transferred onto a 0.2 µm nitrocellulose sheet at 100 volts for one hour. The membrane was reacted with rabbit 078 antiserum. Anti-rabbit immunoglobulin conjugated to peroxidase was used as the secondary antibody. O-chain LPS bands were revealed using 4-chloro-1-naphtol solution.

**Acid shock.** Acid shock of the cell cultures was carried out by using protocol A from Chang and Cronan (10). As survival following acid shock is influenced by growth phase, preliminary growth curves were done for all strains in LB broth at 37°C with agitation (150 rpm). Growth was monitored spectrophotometrically at 600 nm. For the acid shock treatment, strains were grown to the early stationary phase in LB. Prior to acid shock, viable cell counts were done by spreading out dilutions of the suspension on LB agar plates (pH 7). Then, HCl (1.7 N) was rapidly added to cultures grown in LB medium until a pH of 3.0 was reached. The pH values were monitored by pH measurements on identical but separate cultures. After acid addition, the cultures were shaken at 37°C and at different times aliquots were diluted and

plated for colony formation on LB plates. The survival rate was calculated as the CFU determined at each time point over the initial CFU present at time zero.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using the data analysis package SYSTAT 10.0. Analysis of variance followed by Tukey multiple comparisons test was used for the results analysis of bacterial counts, lesion scores, the serum, polymyxin and acid shock assays. For *in vitro* assays, the mean values were obtained from a minimum of three independent values. Statistical significance was established at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

To evaluate if a *pst* mutation affects the virulence of an avian pathogenic O78 strain, inactivation of the *pst* genes was achieved in strain  $\chi 7122$  by suicide-vector mediated allelic exchange (27). Inactivation of *pst* was confirmed by PCR and Southern blot analyses, and a confirmed mutant was named K3 (Table 1). Restoration of the Pst system in this strain was achieved by complementation with plasmid pAN92 which contains a functional *pst* operon. This generated strain CK3. Mutations of the *pst* operon are known to deregulate the repressed state of the Pho regulon in high phosphate conditions and lead to constitutive expression of Pho regulated genes (47). Thus, evaluation of the state of activity of the Pho regulon in strains grown in high phosphate medium (LB) or low phosphate medium (LP) was achieved by

measurement of alkaline phosphatase (AP) activity and by RT-PCR. These experiments revealed that the K3 *pst* mutant exhibits a constitutive Pho phenotype (2948 units AP) compared to the  $\chi$ 7122 wild-type strain (0 unit AP), to the K3 complemented strain CK3 (16 units AP) and  $\chi$ 7122 wild-type strain plus pAN92 (0 unit AP). RT-PCR experiments were used to evaluate the transcriptional state of both the *pst* operon and Pho regulon. As expected, the expression of the *pst* operon, measured by *pstA* expression, is higher in the wild-type strain grown in low phosphate than when grown in high phosphate medium (LB) (Figure 1). The *pstA* expression level is also low in the wild-type strain and the *pst* mutant complemented with pAN92 (CK3) (Fig. 1). There is no *pstA* transcript detected from strain K3 since *pstCAB* are absent in this strain. However, the Pho regulon is constitutive in *pst* mutant strain K3, since *phoB* expression in this strain grown in high phosphate showed similar transcription levels than the wild-type strain grown in low phosphate conditions (Figure 1). In the complemented strain, the repression of transcription of *phoB* is restored in high phosphate.

**Pathogenicity.** To characterize *pst* mutant strain K3, we first evaluated the virulence potential of this strain compared to the wild-type APEC strain  $\chi$ 7122 in a chicken experimental model. Colibacillosis lesions were present in air sacs, liver and heart of chickens infected with APEC strain  $\chi$ 7122 48 hours post-infection (Table 2). By contrast such lesions were minimal or absent from the organs of chickens infected with *pst* mutant strain K3. Complementation of the

*pst* mutation restored the severity of the colibacillosis lesions to a level similar to that observed in chickens infected with the wild-type parent strain  $\chi$ 7122. Also, in chickens infected with strain K3, fewer bacteria were isolated from the bloodstream and all tissues 48 hours post-infection, compared to either the wild-type parent or complemented mutant (Figure 2). Bacterial viable counts from the *pst* mutant were significantly reduced in blood, lungs and spleen 48 hours post-infection. No significant differences in bacterial numbers were observed in tissues or blood of chickens infected with either the wild-type strain or the complemented *pst* mutant CK3.

**Resistance to serum, polymyxin and acid shock.** To provide further insight as to why a *pst* mutant of strain  $\chi$ 7122 is attenuated, or whether inactivation of *pst* alters cell surface components, we investigated the capacity of the wild-type and mutant strains to resist serum, acid and polymyxin. The K3 *pst* mutant is sensitive to the bactericidal effect of rabbit serum (Figure 3A). In contrast, the  $\chi$ 7122 wild-type strain is resistant to the bactericidal effect of serum and was able to multiply in 90% rabbit serum after a 3 hours period. Statistical analysis showed that differences between the wild-type and K3 mutant strains were highly significant at 1, 2 and 3 hours. There was no difference between the wild-type strain and CK3. In contrast to the results obtained for bacterial susceptibility to rabbit serum, wild-type strain  $\chi$ 7122 and the *pst* mutant strain K3 were both resistant to the bactericidal effects of chicken serum (Figure 3B). However, the O78-negative LPS mutant  $\chi$ 7145 (9) was rapidly killed by

chicken serum and was not recovered from samples 1 hour following serum exposure (data not shown).

Strain K3 was more sensitive to polymyxin compared to the  $\chi$ 7122 wild-type strain since the MIC of the mutant strain was two-fold lower (1  $\mu$ g/ml compared to 2  $\mu$ g/ml), than for the  $\chi$ 7122 wild-type strain ( $p < 0.001$ ) (Figure 4). Resistance to polymyxin was only partially restored in the complemented *pst* mutant strain (CK3). Since O78 LPS antigen is an important factor that contributes to the resistance of strain  $\chi$ 7122 to serum (36), and modification of LPS can affect polymyxin resistance, LPS profiles were examined. No differences between strains were observed in their LPS profiles by silver staining (Figure 5) or by Western blot using O78-specific antiserum (data not shown).

The *pst* mutant strain K3 clearly lost the ability to resist acid shock compared to the  $\chi$ 7122 wild-type strain. Indeed, at two hours following acid shock, viability of the K3 *pst* mutant cells was dramatically decreased (Figure 6). By contrast, the  $\chi$ 7122 wild-type strain was more resistant to acid shock and CFU stabilized after 2 to 4 hours of exposure to acid. Differences between the wild-type and the mutant strains were significant at 1, 2, 3 and 4 hours following acid shock. The complemented *pst* mutant strain CK3 was very sensitive to acid shock. At 1 hour following acid exposure, CK3 viability was reduced by greater than 4 log and no CFUs were present after 2 hours in acid-treated culture. The survival rate of the *pst* mutant strain K3 was significantly lower than the survival rate of



the wild-type strain  $\chi 7122$  at each time point ( $p < 0.035$ ). However, the complementation of mutant K3 with pAN92 did not restore the wild-type survival rate phenotype. The presence of plasmid pAN92 in the wild-type strain [ $\chi 7122$  (pAN92)] also decreased the survival rate at each time point when compared to the wild-type survival rate.

## DISCUSSION

APEC strain  $\chi 7122$  is highly pathogenic for poultry and belongs to the O78 serogroup. This is one of the most prevalent serogroups associated with avian *E. coli* infections. In this study, we show that a *pst* mutation reduces the virulence of APEC strain  $\chi 7122$  and that certain virulence traits are modified. Indeed, *in vivo* experiments revealed that the ability of this strain to cause colibacillosis lesions and to survive systemically is significantly reduced in a chicken experimental infection model. Also, the resistance of APEC strain  $\chi 7122$  to the bactericidal effect of rabbit serum and to acid shock is diminished in the *pst* mutant. In addition, sensitivity to the cationic peptide polymyxin was increased in the *pst* mutant strain K3. A decreased capacity to resist these conditions would suggest a decrease in cell surface integrity and could explain, at least in part, the loss of virulence attributed to deletion of *pst* genes.

Multiple virulence traits are affected in the K3 *pst* mutant, and its virulence is significantly reduced. The *pst* mutant is present in the bloodstream 6 hours

post-infection in experimentally infected chickens, but its numbers are considerably reduced in blood and tissues at 48 hours post-infection. This is in contrast with the O78-negative LPS mutant strain  $\chi$ 7145 (9), which is rapidly cleared from blood and extra-intestinal organs of infected chickens (36). The capacity of the *pst* mutant strain K3 to survive in early stages of infection correlates with the ability of this strain to resist avian serum (Fig. 2B), since only serum-resistant APEC strains are normally able to invade and persist in the bloodstream early in the infectious process and disseminate systemically (9,36). Despite its ability to resist avian serum, the *pst* mutant strain K3 demonstrates a marked and significant reduction of virulence in chickens. The *pst* mutant strain K3 is clearly less able to persist and caused reduced lesions compared to the wild-type parent. Since the *pst* mutation does not contribute to decreased sensitivity to chicken serum or early survival in the chicken infection model, attenuation is likely due to other changes that result in decreased virulence. These may include changes in surface composition or possibly deregulated environmental sensing that may be linked to constitutive expression of the Pho regulon regardless of environmental conditions encountered in host tissues.

In a porcine experimental infection model using an ExPEC strain, a *pst* mutation drastically affected the systemic survival of the mutant, as the strain was not able to colonize extraintestinal organs and was rapidly cleared from the bloodstream (12). The differences in the kinetics of infection and attenuation of either the porcine or avian pathogenic *E. coli* strains in infection models is

possibly due to intrinsic differences between the strains and/or differences in porcine and avian innate immune defenses. The clearly different results in serum susceptibility of the *pst* mutant when challenged with avian serum vs. mammalian serum support a role for differences in innate host immune defenses. On the other hand, the *pst* mutants of the porcine and avian pathogenic *E. coli* strains were both less resistant to *in vitro* stresses including acid shock and resistance to polymyxin (unpublished results), suggesting the Pst system is equally important for the proper functioning of certain virulence traits in either of these strains.

There is a correlation between resistance to the bactericidal effects of serum and the capacity of APEC strains to cause septicemia and mortality (31, 36). For strain  $\chi$ 7122, this is exemplified by the O78-negative LPS mutant which is serum-sensitive and unable to persist in body fluids and internal organs of infected chickens (36). Resistance to the bactericidal effect of complement is a multifactorial phenomenon. Bactericidal resistance to serum can correlate with the expression of proteins and of certain capsular K antigens that in many cases can act in concert with the O polysaccharide (65). However, analysis and comparison of the LPS O-chain by SDS-PAGE and Tricine SDS-PAGE (figure 5) did not reveal important differences between wild-type strain  $\chi$ 7122 and the *pst* mutant strain K3. Indeed, no apparent differences are seen in the pattern and the length of the O-chains nor in the estimated molecular weight of lipid A. However, we cannot rule out the possibility that subtle modifications could

occur in the LPS molecules in consequences of the *pst* mutation. Thus, finer approaches are necessary to detect these kinds of modifications and this will be the subject of future investigations. Strain  $\chi$ 7122 has a K80 capsular antigen which is not a typical capsular polysaccharide antigen, but is more similar to an O-antigen capsule. Atypical K antigens have been shown to be implicated in resistance to serum and are important for full virulence (20, 38, 39). Capsular content was tested by colorimetric assay (16) in strain  $\chi$ 7122 and its *pst* mutant and was found to be similar (data not shown). The K80 capsule has not been characterized yet. However, it is known that these types of  $K_{LPS}$  are anchored to the cell surface by a lipid A moiety. Thus, a perturbation of cell surface could also affect the proper anchoring of K80 antigen.

The increased sensitivity of strain K3 to polymyxin further suggests that mutation of *pst* causes some surface structure modification. As polymyxin is a cationic peptide, the bacterial resistance to polymyxin is due, at least in part, to cell surface components. In Gram negative bacteria, some cationic peptides have low affinity for the K antigen and LPS and these structures repel cationic peptides from the outer membrane. Change of the bacterial surface net charge such as modifications of lipid A can confer sensitivity to polymyxin (8). In *Rhizobium meliloti*, mutation in *phoCDET* genes, homologues of *E. coli pst* genes, results in a significant reduction in membrane phospholipid content (18). Perturbation of the cell surface including alteration of fluidity and modification of some components could explain, at least in part, the increased sensitivity of

the K3 *pst* mutant to mechanisms affecting the cell membrane such as those involved in resistance to serum, polymyxin, and acid.

Acid resistance is an important feature of pathogenic bacteria. Persistence of APEC in poultry facilities is associated to their capacity to resist acidic environments (31, 66). In addition, coprophagy of poultry leads to ingestion of contaminated feces. Thus, bacterial cells must repetitively survive gastric challenge but also membrane attack by volatile fatty acids in the less acidic environment of the intestine to persist in poultry facilities (43). Deletion of the *pst* operon significantly reduced the acid resistance of APEC strain  $\chi$ 7122. Indeed, the *pst* mutant K3 had a three log lower survival rate than that of the parent strain  $\chi$ 7122, after a 4 hour challenge at pH 3 without habituation. The Pho regulatory system has been suggested to sense external acidity and regulate transcription of genes that are important for acid shock resistance. It was reported that the acid-inducible *asr* (acid shock RNA) gene in *E. coli* is under the transcriptional control of the *phoBR* operon (50, 55). Asr may play a role similar to that of the periplasmic protein HdeA, by serving as a proton well or chaperone that protects other periplasmic proteins from deleterious effects of low pH and/or by preventing aggregation of denatured proteins (17, 45). Thus it is possible that inactivation of the *pst* system contributes to sensitivity to acid shock in APEC strain  $\chi$ 7122, by affecting the regulation of such genes, that are part of the Pho regulon and are implicated in acid resistance mechanisms. Complementation of the mutant strain did not restore the wild-type acid

resistance phenotype (Figure 6). The acid sensitivity of the complemented mutant could be due, at least in part to gene dosage due to a medium copy plasmid.

Altogether, the alterations of virulence traits in a *pst* mutant of APEC O78 strain  $\chi$ 7122 contribute to its reduced virulence in a chicken infection model. Since constitutive expression of Pho is observed in *pst* mutants, the pleiotropic effects observed in these mutants could be indirectly due to the activation of the Pho network, directly due to effects on phosphate transport, or both. Our results show that deletion of the *pst* operon reduced virulence of avian and porcine ExPEC strains and conferred increased susceptibility to rabbit serum, acid and polymyxin (This study and Daigle, F., Lamarche, M.G., *et al.*, unpublished data). These phenotypic changes suggest that alterations in bacterial surface composition may occur in the absence of the *pst* operon. More in depth investigation needs to be done to identify the functions associated with *E. coli* virulence genes that are under the control of the Pho regulon. Functional genomics and proteomics could provide opportunities to advance such findings. The central control element of the Pho regulon is the PhoB-PhoR two-component system. It has been shown that some compounds are potent inhibitors of specific bacterial two-component systems and possess antibacterial activity (5). Drugs that induce the expression of the Pho regulon could have some utility as therapeutic agents that would compromise bacterial virulence and facilitate elimination of the pathogen through host immune defences. Thus,

the Pst system and the associated Pho regulon could be potential drug targets to treat extra-intestinal diseases associated with pathogenic *E. coli*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant to J.H. from the Fonds des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). For this project, C.M.D. was funded by NSERC. Virulence studies were funded in part by USDA NRI grant 2002-35201-11607 (RC).

We are grateful to Melha Mellata and John M. Fairbrother for their early work on the chicken serum resistance assay. We thank Mahendrasingh Ramjeet, Josée Labrie and Dr. Mario Jacques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, for their advice concerning LPS analysis and polymyxin assay. We also thank Virginie E. Bérubé, Université du Québec à Montréal, TOXEN, for statistical assistance.

## REFERENCES

1. **Adiri, R. S., U. Gophna, and E. Z. Ron.** 2003. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 222:199-203.
2. **Babai, R., G. Blum-Oehler, B. E. Stern, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 149:99-105.
3. **Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockett, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang, and M. S. Donnenberg.** 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* 45:1079-1093.
4. **Barnes, H. J., J.-P. Vaillancourt, and W. B. Gross.** 2003. Colibacillosis, p. 631-52. *In* Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne (ed.), *Diseases of poultry*, 11 ed. Iowa State Press.
5. **Barrett, J. F., and J. A. Hoch.** 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 42:1529-1536.
6. **Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques, and J. Harel.** 2003. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71:4516-4525.
7. **Blanco, A. G., M. Sola, F. X. Gomis-Ruth, and M. Coll.** 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (Camb)* 10:701-713.
8. **Breazeale, S. D., A. A. Ribeiro, and C. R. Raetz.** 2003. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. An aminotransferase (ArnB) that generates UDP-4-deoxyl-L-arabinose. *J. Biol. Chem.* 278:24731-24739.



9. **Brown, P. K., and R. Curtiss, 3rd.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93:11149-11154.
10. **Chang, Y. Y., and J. E. Cronan, Jr.** 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 33:249-259.
11. **Cherifi, A., M. Contrepolis, B. Picard, P. Goulet, I. Orskov, and F. Orskov.** 1994. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections. J. Clin. Microbiol. 32:1197-1202.
12. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. Infect. Immun. 63:4924-4927.
13. **Daigle, F., Hou, J.Y., Clark-Curtiss, J.E.** 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS), p. 108-122, Methods in enzymology, vol. 358. Elsevier Science.
14. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:247-252.
15. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infect. Immun. 68:4145-4154.
16. **Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith.** 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. Nature 168:167.

17. **Gajiwala, K. S., and S. K. Burley.** 2000. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* 295:605-612.
18. **Geiger, O., V. Rohrs, B. Weissenmayer, T. M. Finan, and J. E. Thomas-Oates.** 1999. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol. Microbiol.* 32:63-73.
19. **Giacometti, A., O. Cirioni, R. Ghiselli, L. Goffi, F. Mocchegiani, A. Riva, G. Scalise, and V. Saba.** 2000. Polycationic peptides as prophylactic agents against methicillin-susceptible or methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 44:3306-3309.
20. **Goldman, R. C., K. Joiner, and L. Leive.** 1984. Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. *J. Bacteriol.* 159:877-882.
21. **Gophna, U., T. A. Oelschlaeger, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 2001. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* 196:57-60.
22. **Graham, J. E., and J. E. Clark-Curtiss.** 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:11554-11559.
23. **Haldimann, A., L. L. Daniels, and B. L. Wanner.** 1998. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon. *J. Bacteriol.* 180:1277-1286.
24. **Harel, J., and C. Martin.** 1999. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.* 30:131-155.

25. **Hitchcock, P. J., and T. M. Brown.** 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154:269-277.
26. **Jans, D. A., A. L. Fimmel, L. Langman, L. B. James, J. A. Downie, A. E. Senior, G. R. Ash, F. Gibson, and G. B. Cox.** 1983. Mutations in the *uncE* gene affecting assembly of the c-subunit of the adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 211:717-726.
27. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* 109:137-141.
28. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.
29. **Khan, M. A., and R. E. Isaacson.** 2002. Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection. *Infect. Immun.* 70:3404-3412.
30. **Kim, S. K., S. Kimura, H. Shinagawa, A. Nakata, K. S. Lee, B. L. Wanner, and K. Makino.** 2000. Dual transcriptional regulation of the *Escherichia coli* phosphate-starvation-inducible *psiE* gene of the phosphate regulon by PhoB and the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. *J. Bacteriol.* 182:5596-5599.
31. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* 73:27-35.
32. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
33. **Lesse, A. J., A. A. Campagnari, W. E. Bittner, and M. A. Apicella.** 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods.* 126:109-117.

34. **Mantis, N. J., and S. C. Winans.** 1993. The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli phoB* mutation and is required for virulence. *J. Bacteriol.* 175:6626-6636.
35. **Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174:1-7.
36. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect. Immun.* 71:536-540.
37. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 170:2575-2583.
38. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect. Immun.* 60:5048-5056.
39. **Ngeleka, M., M. Jacques, B. Martineau-Doize, F. Daigle, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 1993. Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165(1) fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 61:836-843.
40. **Oka, A., H. Sugisaki, and M. Takanami.** 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J. Mol. Biol.* 147:217-226.
41. **Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect. Immun.* 60:4460-4467.
42. **Rao, N. N., and A. Torriani.** 1990. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4:1083-1090.

43. **Richard, H. T., and J. W. Foster.** 2003. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv. Appl. Microbiol.* 52:167-186.
44. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181:1753-1754.
45. **Seputiene, V., D. Motiejunas, K. Suziedelis, H. Tomenius, S. Normark, O. Melefors, and E. Suziedeliene.** 2003. Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *J. Bacteriol.* 185:2475-2484.
46. **Spira, B., and E. Yagil.** 1999. The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 38:80-85.
47. **Steed, P. M., and B. L. Wanner.** 1993. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J. Bacteriol.* 175:6797-6809.
48. **Stordeur, P., A. Brée, J. Mainil, and M. Moulin-Schouleur.** 2004. Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicaemic lesions. *Microbes. Infect.* 6:637-645.
49. **Surin, B. P., H. Rosenberg, and G. B. Cox.** 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J. Bacteriol.* 161:189-198.
50. **Suziedeliene, E., K. Suziedelis, V. Garbenciute, and S. Normark.** 1999. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J. Bacteriol.* 181:2084-2093.
51. **Taylor, P. W., and H. P. Kroll.** 1983. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infect. Immun.* 39:122-131.
52. **Taylor, R. K., C. Manoil, and J. J. Mekalanos.** 1989. Broad-host-range vectors for delivery of *TnphoA*: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 171:1870-1878.

53. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76:4350-4354.
54. **Tsai, C. M., and C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119:115-119.
55. **Tucker, D. L., N. Tucker, and T. Conway.** 2002. Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:6551-6558.
56. **VanBogelen, R. A., E. R. Olson, B. L. Wanner, and F. C. Neidhardt.** 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178:4344-4366.
57. **Vieira, J., and J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* 19:259-268.
58. **von Kruger, W. M., S. Humphreys, and J. M. Ketley.** 1999. A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology.* 145 ( Pt 9):2463-2475.
59. **Wanner, B. L.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51:47-54.
60. **Wanner, B. L.** 1992. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J. Bacteriol.* 174:2053-2058.
61. **Wanner, B. L.** 1996. 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, D.C.

62. **Wanner, B. L., M. R. Wilmes, and D. C. Young.** 1988. Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant by adenyl cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon. *J. Bacteriol.* 170:1092-1102.
63. **White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, and T. S. Whittam.** 1993. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb. Pathog.* 14:399-409.
64. **White, D. G., R. A. Wilson, D. A. Emery, K. V. Nagaraja, and T. S. Whittam.** 1993. Clonal diversity among strains of *Escherichia coli* incriminated in turkey colisepticemia. *Vet. Microbiol.* 34:19-34.
65. **Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31:1307-1319.
66. **Zhu, C., M. Ngeleka, A. A. Potter, and B. J. Allan.** 2002. Effect of fur mutation on acid-tolerance response and in vivo virulence of avian septicemic *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 48:458-462.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
Bacterial strains		
SM10 $\lambda$ <i>pir</i>	<i>thi-1, leu, tonA, lacY, supE,</i> <i>recA::RP4-2-Tc::Mu, <math>\lambda</math>pir, Km<sup>r</sup></i>	37
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17,</i> <i>supE44, relA1, lac [F' proAB lac<sup>r</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene
$\chi$ 7122	Avian pathogenic strain O78:K80:H9 <i>gyrA</i> , Nal <sup>r</sup>	41
$\chi$ 7122 (pAN92)	$\chi$ 7122 + pAN92	This work
K3	$\chi$ 7122 $\Delta$ <i>pstCAB::kan</i>	This work
CK3	K3 + pAN92	This work
$\chi$ 7145	$\chi$ 7122, <i>rfb</i> deleted by replacement with <i>E. coli</i> K-12 region at 45 min	9
Plasmids		
pAN92	pACYC184:: <i>pst</i> operon, Cm <sup>r</sup>	26
pCR2.1	Cloning vector	Invitrogen
pKNG101	suicide vector Sm <sup>r</sup> , <i>sacB</i>	27
pKNG800K	pKNG101 - $\Delta$ <i>pstCAB::kan, sacB</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	This work
pUC71K	Contains <i>aphT</i> with transcription terminator, Kan <sup>r</sup>	40, 57

<sup>a</sup>Kanamycin, Km<sup>r</sup>; Chloramphenicol, Cm<sup>r</sup>; Streptomycin, Sm<sup>r</sup>; Nalidixic acid, Nal<sup>r</sup>; Tetracyclin Tet<sup>r</sup>



Table 2: Score based evaluation of colibacillosis lesions

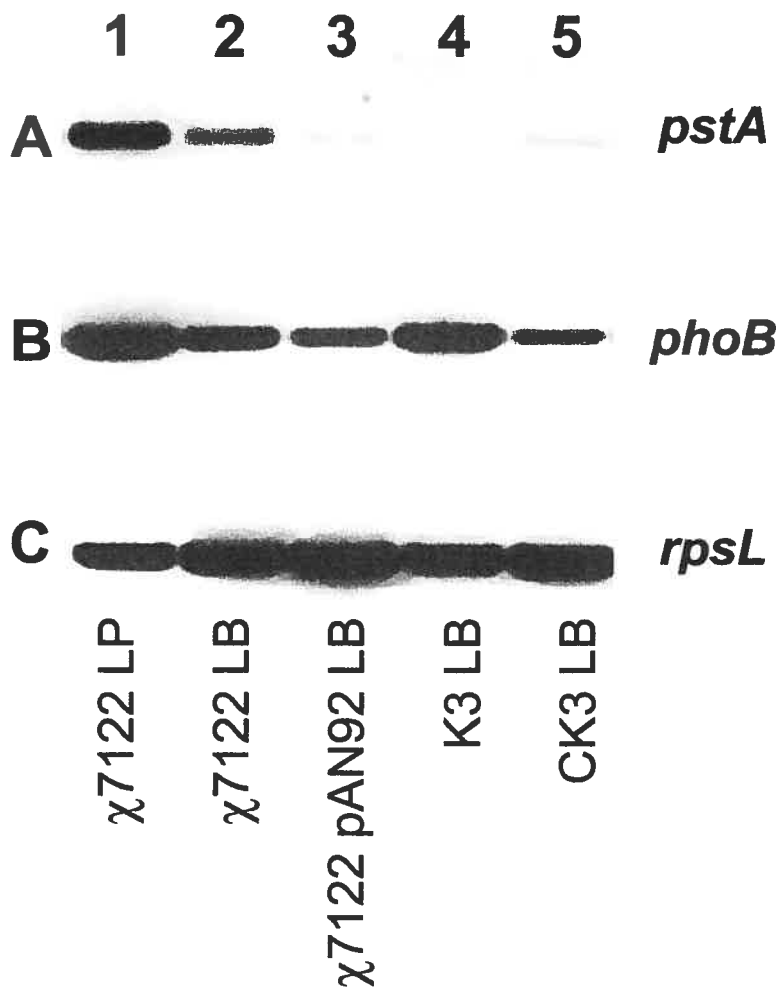
Strains	Airsacculitis <sup>a</sup>	Pericarditis/perihepatitis <sup>b</sup>
$\chi$ 7122	2.56 $\pm$ 0.25	2.43 $\pm$ 1.07
K3	1.63 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>	1.06 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>
CK3	2.29 $\pm$ 1.01	2.70 $\pm$ 0.90

<sup>a</sup> Lesion scoring values for airsacculitis in both caudal thoracic air sacs  $\pm$  standard deviation. See methods for scoring scheme.

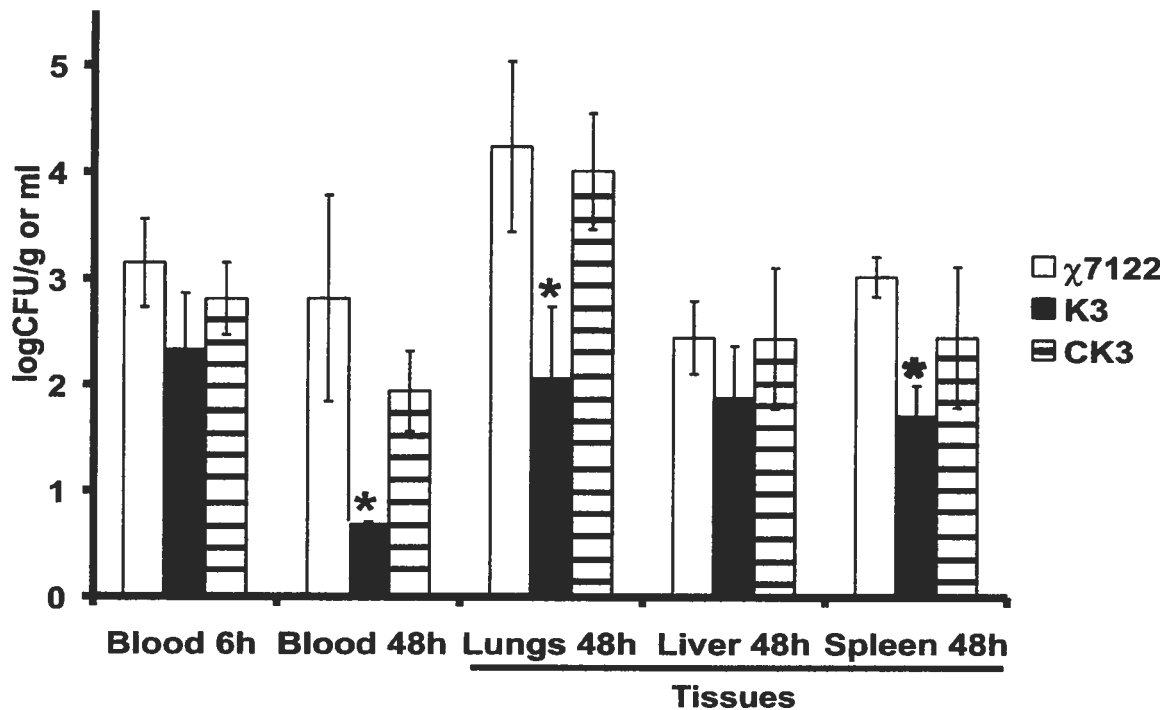
<sup>b</sup> Combined lesion scoring values for pericarditis and perihepatitis  $\pm$  standard deviation. See methods for scoring scheme.

<sup>c</sup> P = 0.046 compared to lesions observed for the wild-type strain infected group.

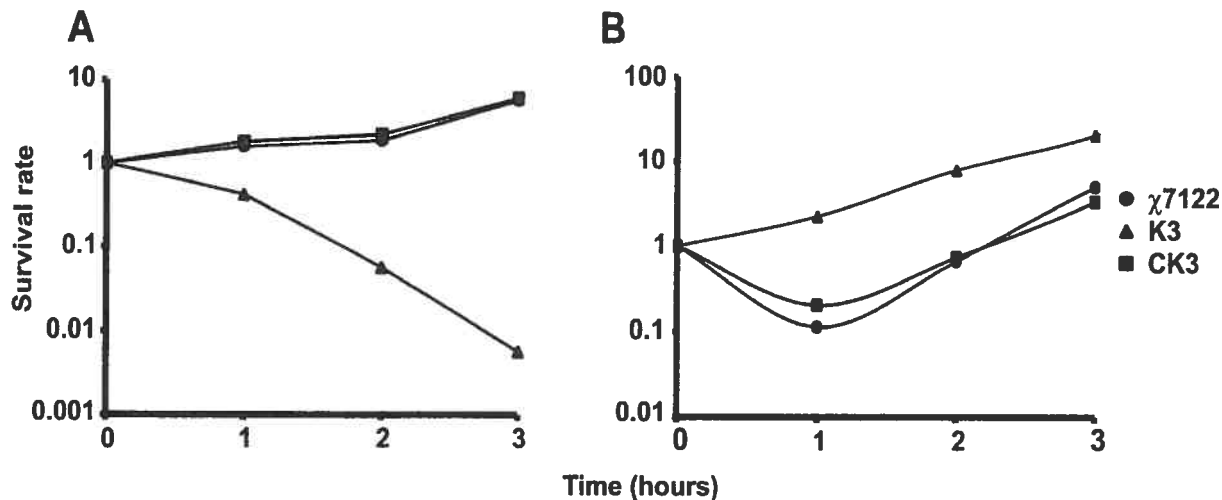
<sup>d</sup> P = 0.0017 compared to lesions observed for the wild-type strain infected group.



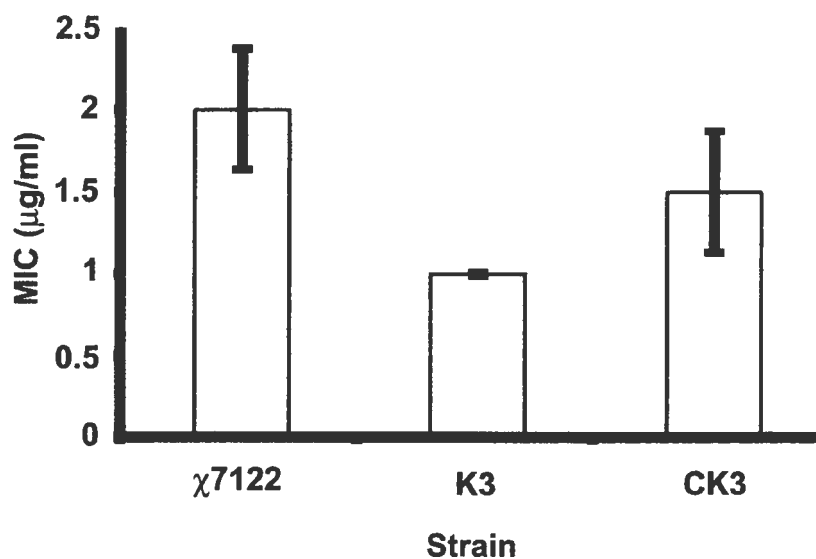
**FIG. 1.** Transcriptional analysis of the *pst* operon and Pho regulon in *E. coli* strain  $\chi$ 7122 and its mutants. RT-PCR was performed to detect the presence of *pstA* (A), *phoB* (B) and *rpsL* (C) mRNA in strain  $\chi$ 7122 and isogenic *pst* mutants. cDNA from  $\chi$ 7122 (wt) grown in low phosphate (LP) medium and from  $\chi$ 7122 ,  $\chi$ 7122 (pAN92), K3 ( $\Delta$  *pstCAB::kan*) and CK3 (K3 [pAN92]) grown in high phosphate (LB) medium are shown in lanes 1 to 5, respectively. RNA was isolated from mid-log phase cells. There is no *pstA* transcript in K3 since *pstCAB* are absent in this strain. The *rpsL* transcript was used as a housekeeping control.



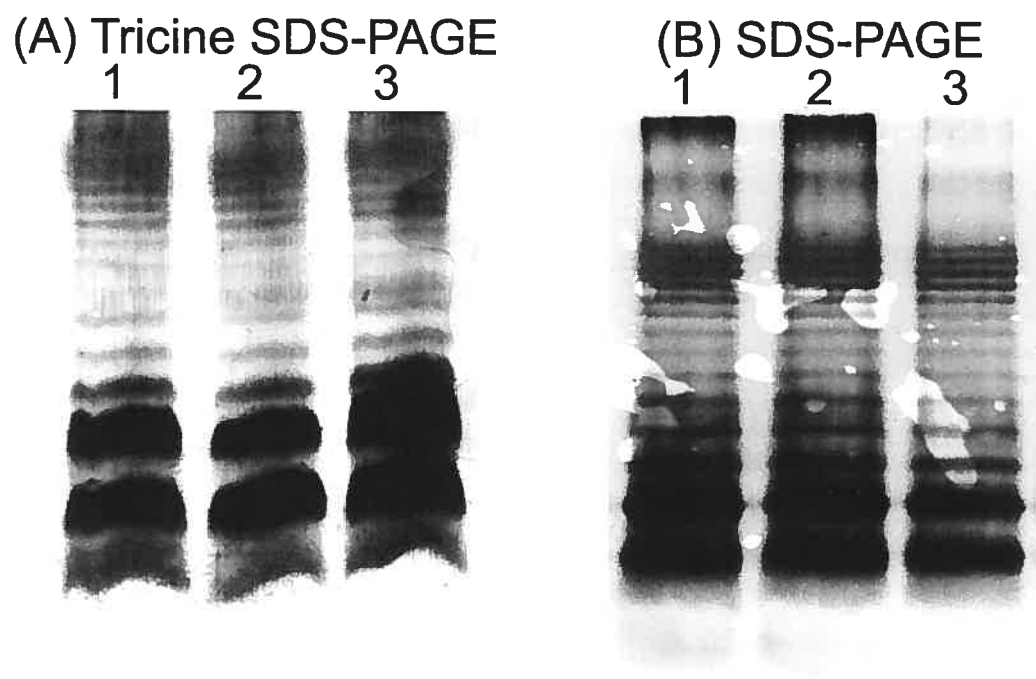
**FIG. 2.** Experimental infection of chickens with APEC strain  $\chi 7122$  or derivatives via the air sacs. Colony forming units (CFU) per gram of tissue or milliliter of blood 6 and 48 hours post-infection. Strain  $\chi 7122$  (wild-type); strain K3 ( $\Delta pstCAB::kan$ ); strain CK3 (K3 [pAN92]). Asterisks (\*) indicate significant differences observed between bacterial quantification of the wild-type  $\chi 7122$  and the *pst* mutant strain K3 in blood ( $p=0.0048$ ), lungs ( $p=0.0059$ ) and spleen ( $p=0.0003$ ) 48 hours post-infection. No significant differences in bacterial numbers were observed between the wild-type  $\chi 7122$  strain and the complemented strain CK3.



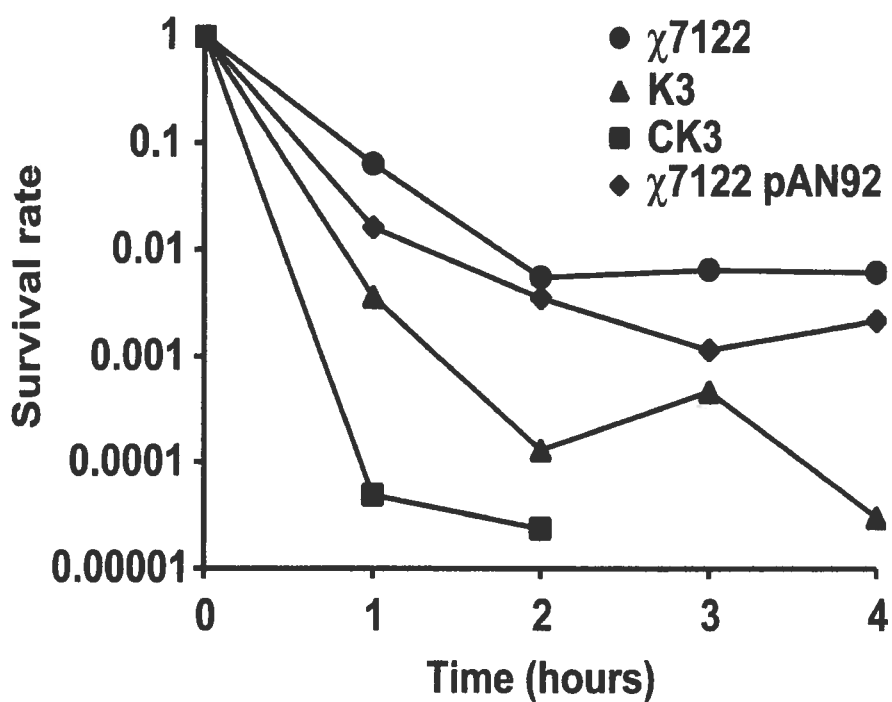
**FIG. 3.** Bacterial resistance to serum. Survival and growth of *E. coli* wild-type strain  $\chi7122$  and *pst* mutants in 90% rabbit (A) or chicken (B) serum for various periods of time. ●, strain  $\chi7122$  (wild-type); ▲, strain K3 ( $\Delta pstCAB::kan$ ); ■, strain CK3 (K3 [pAN92]) Results presented are means of three distinct tests. (A) The survival rate of the *pst* mutant strain K3 is significantly lower than the survival rate of both, wild-type strain  $\chi7122$  and complemented strain CK3, at each time point. From 1 to 3 hrs of exposure in rabbit serum, the *pst* mutant K3 was significantly more sensitive to serum than either strain  $\chi7122$  ( $p < 0.006$ ) and CK3 ( $p < 0.004$ ). No significant differences were observed between the wild-type  $\chi7122$  strain and the complemented strain CK3. (B) No statistical differences were observed between the survival rates of strains  $\chi7122$ , K3 and CK3 after exposure in chicken serum. The control strain  $\chi7145$  ( $\chi7122 rfb^-$ ) did not survive after 1 hour of exposure to 90% chicken serum (data not shown).



**FIG. 4.** Polymyxin assay. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of polymyxin necessary to inhibit growth of the different strains. The MIC was considered the lowest drug concentration that reduced growth by more than 50% compared with growth in the control well. MIC of polymyxin for strain  $\chi 7122$  (wild-type); strain K3 ( $\Delta psfCAB::kan$ ); strain CK3 (K3 [pAN92]). The MIC of the *psf* mutant strain K3 is significantly lower than the MIC of the wild-type  $\chi 7122$  strain ( $p < 0.001$ ). The MIC differences between the complemented strain CK3 and either strain  $\chi 7122$  or strain K3 are significant ( $p = 0.044$ ).



**FIG. 5.** Analysis of LPS by Tricine SDS-PAGE (A) and SDS-PAGE (B). No differences in LPS profiles were observed among strains. (1) Wild-type  $\chi$ 7122; (2) *pst* mutant strain K3 ( $\Delta$ *pstCAB::kan*); (3) Complemented strain CK3 (K3 [pAN92]).



**FIG. 6.** Acid shock resistance experiment. Survival of wild-type strain  $\chi$ 7122 and mutant derivatives exposed to LB medium (pH 3) for various periods of time. ●, strain  $\chi$ 7122 (wild-type); ▲, strain K3 ( $\Delta$ *pstCAB::kan*); ■, strain CK3 (K3 [pAN92]); ◆, strain  $\chi$ 7122 (pAN92). *In vitro* acid shock tests were carried out on early stationary phase cultures without habituation at 37°C.

**ARTICLE 2**

**Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A  
population under *Escherichia coli* phosphate (Pho)  
regulon activation**

Martin G. Lamarche, Sang-Hyun Kim, Sébastien Crépin, Michael Mourez,  
Nicolas Bertrand, Russell E. Bishop, J. Daniel Dubreuil, Josée Harel<sup>1</sup>

Manuscrit soumis dans The Journal of Bacteriology

MS No. JB01536-07



**Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under  
*Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation**

**Running title: Lipid A Structure Modification induced by a *pst*  
mutation**

Martin G. Lamarche<sup>1</sup>, Sang-Hyun Kim<sup>2,3</sup>, Sébastien Crépin<sup>1</sup>, Michael  
Mourez<sup>1</sup>, Nicolas Bertrand<sup>1</sup>, Russell E. Bishop<sup>2</sup>, J. Daniel Dubreuil<sup>1</sup>, Josée  
Harel<sup>1\*</sup>

(1) Groupe 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, (2) Department of Biochemistry and  
Biomedical Sciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada,  
L8N 3Z5, (3) The National Primate Research Center, KRIBB, OChang,  
Chungbuk 363-883, Republic of Korea

\*Author for correspondence: Josée Harel

Telephone: (450) 773 8521 ext 8233

Fax: (450) 778 8108

e-mail: [josee.harel@umontreal.ca](mailto:josee.harel@umontreal.ca)

**Abstract.**

Environmental phosphate is an important signal for microorganism gene regulation and it has recently been shown to trigger some key bacterial virulence mechanisms. In many bacteria, the Pho regulon is the major circuit involved in adaptation to phosphate limitation. The Pho regulon is controlled jointly by the two-component regulatory system PhoR/PhoB and by the phosphate specific transport (Pst) system, which both belong to the Pho regulon. We showed that a *pst* mutation results in virulence attenuation in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) strains. Resistance to the bactericidal effects of serum and to acid shock is affected in these mutants. We hypothesized that the bacterial cell surface of the *pst* mutants is altered. To verify our hypothesis, different assays were used to compare wild-type strains and their isogenic *pst* mutants. Either high phosphate or low phosphate medium was used for bacterial growth. LP medium permits comparison of Pho-activated wild-type strains with *pst* mutants, the former being characterized by a constitutive activation of the Pho regulon. In this paper, we demonstrate that the *E. coli* *pst* mutants sensitivity to different cationic antimicrobial peptides can be correlated with an unexpected *pst* mutation-mediated lipid A modification. We discuss how some lipid A structural modifications could contribute to such bacterial surface perturbations. Finally, our results indicate that the Pho regulon is involved in lipid A modifications. Since the Pho regulon and the Pst system are conserved in many bacteria, such a lipid A modification mechanism could be widely distributed among Gram-negative bacterial species.

## Introduction

Under circumstances such as drastic environmental changes, the phenotypic diversity occurring within a bacterial cell population due to noise in gene expression favours the natural selection of subpopulations best fit to survive (42, 44, 45). In addition, bacteria possess more specialised machineries, the two-component regulatory systems, which permit sensing and response to environmental changes (22). Environmental stimuli are translated into signalling events leading to the expression of a highly precise response. One such system is PhoR/PhoB (52, 53), which responds to environmental phosphate concentration variations and controls expression of at least 37 genes in *Escherichia coli* (Pho regulon) (3, 18, 20, 46, 53). PhoR is an inner membrane sensor protein that responds to periplasmic orthophosphate ( $P_i$ ) through interaction with the phosphate specific transport (Pst) system. The activation signal is a  $P_i$  concentration below 4  $\mu\text{M}$ . Under these conditions, PhoR is autophosphorylated on a conserved histidine residue and transfers this phosphoryl group to a conserved aspartate residue on its cognate response regulator PhoB. To initiate or repress gene transcription, Phospho-PhoB binds specific DNA sequences known as Pho-Boxes, which are located upstream of Pho-dependent genes. The Pst system, which belongs to the Pho regulon, encodes an ATP-binding cassette transporter involved in high affinity acquisition of  $P_i$ . In many bacterial species, mutations in the Pst system result in constitutive expression of the Pho regulon regardless of environmental phosphate availabilities.

Many studies reported an association between the Pst system, the Pho regulon, and bacterial virulence (for a comprehensive overview see reference 30). However, molecular mechanisms that link the Pho regulon and the virulence of bacteria have not been fully established. For this research, we focused our work on extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) strains.  $\chi$ 7122 (O78:K80) (38) and 5131 (O115:K"V165")(19) are ExPEC strains that share many virulence attributes and cause extra-intestinal infections in poultry and swine, respectively. Pleiotropic effects and loss of virulence was observed in *pst* mutants of extra-intestinal strains  $\chi$ 7122 and 5131 (11, 29, 34). Many phenotypes of *pst* mutants, such as sensitivity to acid stress and the bacteriolytic effect of serum, are suggestive of important changes in cell surface properties.

The outer leaflet of the outer membrane (OM) of Gram-negative bacteria is composed, in most part, of approximately two million copies of a complex glycolipid named lipid A (40). The lipid A is the anchor for the core oligosaccharide, which is usually linked to the O antigen polysaccharide that is exposed on the bacterial cell surface (4, 40, 50). The entire molecule, the lipopolysaccharide (LPS), protects bacteria from various environmental stresses that can be encountered outside and inside the host (13, 35). In *E. coli* and *Salmonella typhimurium*, two-thirds of the total membrane lipid A molecules consist of the 1-monophosphate form of the phosphorylated and acylated di-glucosamine structure (Fig. 1). The remaining one-third possesses a pyrophosphoryl group at the C1 position (Fig.1). Bacterial pathogens such as *Salmonella typhimurium* and some *E. coli* stains have an

ability to modify their lipid A structure to resist some adverse environmental cues (Fig 1) (17) (40) (15, 16, 48).

As described above, we believed that cell surface perturbations occur in *pst* mutants. Since LPS is a major component of the OM, which can be subjected to certain modifications in bacterial pathogens and plays an important protective role against bactericidal molecules, we decided to investigate LPS structural properties in *pst* mutants. Moreover, since the Pho regulon is constitutively activated in *pst* mutants, it was also possible that phosphate-rich LPS molecules could be subject to specific modifications. Indeed, our results indicate that *pst* mutations induce changes in the lipid A structure that could result in a bacterial cell surface perturbation. This can be correlated with sensitivity of the bacteria to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) such as polymyxin B (PMB). Remarkably, the hexa-acylated 1-pyrophosphate form of lipid A is significantly less abundant in *pst* mutants. We believe that this state of lipid A could participate in the observed membrane perturbation of *pst* mutants.

#### **Materials and methods.**

*Bacterial strains, plasmids and media.* *E. coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) or in LP broth at 37°C. LB is a high phosphate containing medium. LP is a low phosphate containing medium (LP: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% yeast extract, 20 mM glucose, and 1 mM methionine). When required, antibiotics were used at the

following final concentrations: tetracycline 10 µg/ml; kanamycin (Kan), 50 µg/ml; nalidixic acid (NA), 40 µg/ml; chloramphenicol (Cm), 10 µg/ml; streptomycin (Sm), 100 µg/ml.

*Construction of plasmids and mutant strains.* The mutation of the *pst* operon was obtained by allelic exchange as described previously (29). A PCR fragment containing the *pstSCAB* gene was amplified from strain 5131 with the PstF (CTGCCGGATAGTGTAGT) and PstBrev (CATCATGTCCGTGCTCC) primers, and cloned into pCR2.1 vector using the Original TA Cloning kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. A deletion ( $\Delta$ *pstCAB*) in the *pst* operon was obtained by removing an internal *EcoRV* fragment. A kanamycin resistance cassette, *HincII* fragment from pUC71K, was then ligated to the *EcoRV* site resulting in  $\Delta$ *pstCAB::kan*. The construct was digested with *XbaI* and *BamHI* and the  $\Delta$ *pstCAB::kan* fragment was ligated to the pKNG101 suicide vector cut with the same enzymes. The resulting construct, pKNG800K, was transferred to strain SM10 $\lambda$ *pir*, from where it was mobilized into 5131 and  $\chi$ 7122 by conjugation. Single-crossover integrants of strain 5131 and  $\chi$ 7122 were selected on M9 agar containing the appropriate antibiotics (Kan and Sm). Selection for double-crossover allele replacement was obtained by *sacB* counter-selection on LB agar plates without NaCl, containing 5% sucrose (26) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt (XP; 40 µg/ml). 5131 and  $\chi$ 7122 derivatives, strain K2 and K3 respectively, were confirmed to contain a deletion in the *pst* operon as determined by PCR amplification, Southern blot hybridization and RT-PCR (Lamarche et al.

2005 and data not shown). The pAN92 (25) plasmid carrying the functional *pst* operon was used to complement the  $\Delta pstCAB$  mutants to create strain CK2 and CK3.

*Polymyxin B (PMB), cecropin P1 (CPI) and vancomycin assays.*

Experiments were done in LB or LP for bacterial cells growth. Strains were grown overnight and cultures were diluted in fresh medium to obtain cultures in exponential phase. Strains were grown to optical density of 0.7 ( $\lambda = 600$  nm). Cultures were then diluted to obtain  $10^6$  CFU/ml. Microwell plates were loaded with the  $10^6$  CFU/ml cultures and different concentrations of PMB or CPI were added to each well. Plates were incubated overnight and wells were evaluated for growth by spectrophotometry. For vancomycin assays, plates were incubated 3 hours. The MIC was considered the lowest drug concentration that reduced growth by more than 50% compared with growth in the control well (14). Vancomycin survival was calculated from the ratio of vancomycin-exposed to non-exposed cells. Experiments are the mean of three biological and technical replicates. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 4® package. A One-way ANOVA followed by a multiple comparison Tuckey test was applied.

*Analysis of radiolabeled lipid A by Thin Layer Chromatography (TLC).*

Experiments were performed in LB or LP for bacterial cell growth. Analysis of lipid A released by mild acid hydrolysis from  $^{32}\text{P}_i$  labeled cells was adapted from Zhou *et al.* (1999)(58). An overnight culture grown at 37°C

was diluted 100-fold in 5 ml of fresh medium containing appropriate antibiotics and 5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{32}\text{P}_i$ , and allowed to grow for 3h. The  $^{32}\text{P}_i$  labeled cells were harvested by centrifugation and washed once with 5 ml of PBS. The pellet was resuspended in 0.8 ml of PBS and converted into a single-phase Bligh/Dyer mixture by adding 2 ml of methanol and 1 ml of chloroform. After 10 minutes incubation at room temperature, the insoluble material was collected by centrifugation in a clinical centrifuge. The pellet was washed once with 5 ml of a fresh single-phase Bligh/Dyer mixture, consisting of chloroform/methanol/water (1:2:0.8, v/v). This pellet was then dispersed in 1.8 ml of 12.5 mM sodium acetate, pH 4.5, containing 1% SDS, with sonic irradiation in an ultrasonic bath. The mixture was incubated at 100°C for 30 minutes to cleave the ketosidic linkage between the first inner core 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid unit and the distal glucosamine sugar of lipid A. After cooling, the boiled mixture was converted to a two-phase Bligh/Dyer mixture (6) by adding 2 ml of chloroform and 2 ml of methanol. Partitioning was made by centrifugation and the lower phase material was collected and washed once with 4 ml of the upper phase derived from a fresh neutral two-phase Bligh/Dyer mixture, consisting of chloroform/methanol/water (2:2:1.8, v/v). The lower phase lipid A sample was collected and dried under a steam of nitrogen gas. The lipid A sample was dissolved in 100 $\mu\text{l}$  of chloroform/methanol (4:1, v/v), and approximately 1000 cpm of the sample was applied to the origin of a Silica Gel 60 TLC plate. TLC was conducted in a developing tank in the solvent chloroform/pyridine/88% formic acid/water (50:50:16:5, v/v). The plate was



dried and visualized with a PhosphorImager (Storm 840 from Molecular Dynamics). Experiments were repeated three times.

*Lipopolysaccharide (LPS) analysis.* Two milligrams of whole bacterial cells, grown onto LB agar plates, were solubilized in Laemmli buffer (28), boiled and treated one hour with proteinase K (0.5 mg/ml) at 60°C. Proteinase K was then inactivated by boiling samples for 2 minutes (21). Classical SDS-PAGE or Tricine SDS-PAGE (32) was used for the LPS analysis. A volume of 10 µl of each sample was added to each well. Silver staining was used to reveal LPS bands (51). Western blot analysis was performed using standard procedure (49). Briefly, LPS bands were transferred onto a 0.2 µm nitrocellulose sheet at 100 volts for one hour. The membrane was treated with rabbit O115, 078 or enterobacterial common antigen (ECA) antiserums. Anti-rabbit immunoglobulin conjugated to peroxidase was used as the secondary antibody. O-chain LPS bands were revealed using 4-chloro-1-naphtol solution.

*Microarray experiments.* Microarray experiments were done using Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array. Briefly, the RNA was isolated from an overnight culture grown at 37 °C was diluted 100-fold into 5 ml of LB and was allowed to grow to mid-log phase (OD<sub>600</sub> 0.6) 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. For cDNA synthesis and biotinylation, two aliquots of 5 µg of RNA (10 µg total) were supplemented with 2 µL of

GeneChip<sup>®</sup> Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) and converted into cDNA using SuperScript II and random hexanucleotide primers (Invitrogen, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's instructions. After treatment with RNase A (1mg/ml), the cDNA were purified using Microcon YM-30 centrifugal filter (Milipore, Billerica, MA). The cDNA was fragmented with DNase I (Ambion, Austin, TX) and then 3' biotinylated using GeneChip DNA Labelling Reagent (7.5 mM) (Affymetrix, Santa Clara, CA) and 60 U of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Promega, Madison, WI). The Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) contains 20,366 genes present in four strains of *E. coli* (MG1655, EDL933, SAKAI and CFT073) and includes over 700 intergenic regions. For supplemental information, see Affymetrix web site: at [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com). Biotinylated cDNAs were hybridized onto Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> *E. coli* Genome 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) as recommended by the manufacturer. Hybridizations were performed at Genome Québec Innovation Centre (McGill University, Montreal, Canada). Data were processed using the robust multiarray average algorithm (RMA) for normalization, background correction and expression value calculation (24). Expression levels obtained from three independent replicates, in each condition, were compared using the FlexArray RC3 software (Michal Blazejczyk, Mathieu Miron, Robert Nadon (2007). FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. Genome Quebec, Montreal, Canada, URL: <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray/index.html>). The robustness of

the data was further enhanced by EB algorithm and *P*-value calculation. The microarrays results were validated by qRT-PCR using the QIAGEN QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR kit, according to the manufacturer's instructions. 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 normalised to the *Ct* obtained for the *tus* gene amplified from the corresponding sample. Fold change were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (33).

*Lipid A extraction and mass spectrometry analysis.* Cell cultures were prepared exactly as for the analysis of radiolabeled lipid A in the TLC experiments, but without the addition of <sup>32</sup>P orthophosphate. A pool of six 5 ml cultures was used for each strain and experiment. Lipid A samples were prepared as described previously, with slight modifications (31, 56). PBS washed cells were resuspended in 300  $\mu$ L of Tri-Reagent (Ambion) and incubated for 20 minutes at room temperature. Then, 30  $\mu$ L of chloroform was added, and the samples were vortexed vigorously and incubated for 15 minutes at room temperature. The phases were separated by centrifugation at 12,000Xg for 10 minutes, and the upper phase was transferred to a new tube. This extraction procedure was repeated twice using 100 $\mu$ L of water instead of chloroform, and the combined upper phases were evaporated in a speed-vac apparatus (DNA120 SpeedVac<sup>®</sup> from ThermoSavant). The lipid A was released from the LPS by mild-acid hydrolysis. The pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of hydrolysis buffer (12.5 mM sodium acetate pH 4.5; 1% SDS) and heated at 100°C for 1 hour, and dried in a speed-vac. To

remove SDS from the samples, washing steps were performed. The pellet was resuspended in a mixture of 100  $\mu$ L of water and 500  $\mu$ L of acidified ethanol (100  $\mu$ L of 4M HCl in 20 ml of 95% ethanol), and centrifuge at 2,060 X g for 10 minutes. The pellet was washed again in 95% ethanol using the same procedure. Washing steps were repeated once. The pellet was dried at room temperature for 5 minutes, and lipid A was dissolved in 100  $\mu$ L of chloroform: methanol: water (2:3:1 v/v). The samples were sent to the Proteomic and Mass Spectrometry Center (PMSC), Molecular Medicine Research Centre, University of Toronto, for the matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis. Preparations for MALDI/TOF analysis were performed by depositing 0.3  $\mu$ L of the sample dissolved in chloroform: methanol (4:1 v/v), followed by 0.3  $\mu$ L of a saturated solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid in 50% acetonitrile as the matrix. The sample was dried at room temperature. Spectra were acquired in both positive and negative ion linear modes. Each spectrum was the average of 50 laser shots.

## Results

### CAMPs and vancomycin assays in phosphate-rich medium

The ExPEC  $\chi$ 7122 and 5131 *pst* mutants are acid and serum sensitive (11, 29). This could be indicative of a bacterial cell surface modification. To further investigate this possibility, we submitted the  $\chi$ 7122 and 5131 ExPEC strains and their isogenic *pst* mutants to CAMP challenges. In LB medium, the sensitivity of *pst* mutants to PMB and to CP1 is slightly increased in contrast to that of wild-type strains (Figure 2A and 2C).

Because of these results, we hypothesized that *pst* mutants should also be sensitive to vancomycin as a consequence of a generalized OM perturbation. Vancomycin is a glycopeptide antibiotic that interferes with peptidoglycan biosynthesis (1). High concentrations of vancomycin are needed to kill *E. coli* cells unless the OM is perturbed (43). We show that a mutation in *Pst* results in an increased vancomycin sensitivity (Fig. 3). Complementation of the *pst* mutation restores the wild-type CAMP and vancomycin resistance level, indicating that the *pst* mutant phenotypes result from the  $\Delta pst::kan$  mutation and not from some polar effects. These results suggest that a bacterial cell surface alteration might exist in *pst* mutants.

#### **LPS analyses in phosphate-rich medium**

Since LPS is one of the first defensive barriers against environmental cues, including those encountered within the host, we first looked at the LPS pattern of expression and at its various immunochemical properties. However, standard SDS-PAGE and Western blot analyses using O78 and O115 antiserum show that the pattern of the O-antigen expression is unaffected in the *pst* mutant strains (Fig. 4A and C). Similarly, there are no apparent difference in the lipid A-core region of the LPS between wild-type, *pst* mutant and complemented *pst* mutant strains, as observed by Tricine SDS-PAGE (Fig. 4B). Furthermore, by Western blot using ECA antiserum, no differences between these strains are observed (Fig. 4D).

### **Radiolabeled lipid A analyses by TLC for strains grown in phosphate-rich medium**

Since the *pst* mutants display PMB sensitivity, which could correlate with lipid A modifications (17, 40, 50), we undertook radiolabeled lipid A analyses by TLC. Because of its known TLC profile, an *E. coli* O157:H7 strain was used as a control (27). Its profile is similar to that of *E. coli* K12 MC1061 except for an additional phosphoethanolamine (pEtN) lipid A variant (27) (Fig. 5A). In *pst* mutants grown in LB, a reduction of 66% of the pyrophosphate form of lipid A (hexa-acylated 1-pyrophosphate lipid A; see Fig. 1A) is reproducibly observed (Figure 5B and 5C), as calculated by densitometry (ImageQuant 5.0).

### **CAMP assays and TLC quantification of 1-pyrophosphate lipid A for strains grown in low-phosphate medium**

To evaluate if the Pho regulon activation-state is indeed involved in the *pst* mutants lipid A phenotype, we evaluated properties of the wild-type, mutant and complemented *pst* mutant strains grown in low phosphate medium (LP). In LP, all strains have the same PMB MIC value. Furthermore, wild-type and complemented *pst* mutant strains have a PMB MIC similar to that of *pst* mutants grown in LB (Fig. 2B). Strikingly, all strains exhibit a similar amount of the hexa-acylated 1-pyrophosphate form of the lipid A (Fig. 5D). Furthermore, these amounts are similar to those obtained for *pst* mutants grown in LB (Fig. 5B and 5C). This observation confirms our hypothesis that the bacterial cell surface is altered in *pst* mutants. Furthermore, it

indicates that the Pho regulon influences the biosynthesis of hexa-acylated 1-pyrophosphate lipid A.

### **MALDI-TOF analysis of APEC strains grown in low-phosphate medium**

For avian strains grown in LP medium, TLC analyses reveal the presence of lipid A variants (Fig. 5D) which are more predominant in the *pst* mutant strain K3 (Fig. 5D). This observation is interesting since lipid A substitutions (Fig. 1) are infrequently observed in *E. coli* in comparison to *S. typhimurium*, in which lipid A variants are often expressed (7, 40, 59). In accordance, lipid A MALDI-TOF analyses of the *pst* mutant K3 grown in LP medium reveal some variations in the lipid A profile when compared to the wild-type strain  $\chi$ 7122 (Fig.6). By comparison with previously known lipid A variant *m/z* values, a molecule corresponding to the hexa-acyl bis-phosphorylated lipid A prototype (*m/z*: 1797) bearing two pEtN residues (*m/z*: 2043) was identified (Fig. 6B). Other ions are also present in the K3 strain (*m/z*: 1996 and 2108), but these species do not correspond with known lipid A structures.

### **Microarray analysis**

A microarray study of the wild-type strain  $\chi$ 7122 and the *pst* mutant K3 grown in high phosphate (LB) medium was used to analyse LPS-related genes at the transcription level (Table 2). All LPS-related genes identified are down-regulated in the *pst* mutant K3 in contrast to the wild-type strain. Many of the genes identified belong to the ECA biosynthesis pathway,

which is encoded by a large operon that constitutes 12 genes (*rfe-wzzE-rffEDGHCA-wzxE-rffT-wzyE-rffM*). Pho boxes are present upstream the *wzxE* and *wzyE* genes as determined by using the Pho box prediction weight matrix elaborated by Finan and colleagues (57). These genes code respectively for a flippase involved in the movement of the ECA trimeric sugar lipid III (Fuc4NAc-ManNAcA-GlcNAc-P-P-undecaprenol) across the inner membrane and for a polymerase likely involved in ECA chain elongation. The *rfaJ* gene belonging to *rfaQGPSBIJYZ-waaU* operon is also down-regulated. The *rfaJ* gene coding for a lipopolysaccharide 1,2-glucosyltransferase is involved in the LPS-core biosynthesis (Table 2). A Pho box is located upstream de *rfaJ* gene as well as just upstream the starting codon of the *rfaP* and *rfaY* genes, which are both kinases involved in LPS inner-core phosphorylation. Concerning the lipid A biosynthetic gene expression, only the *eptA* gene is down-regulated. This gene is an ortholog of *Salmonella pmrC* involved in pEtN covalent modification of the lipid A (31). Gene candidates coding for putative factors that could be involved in the loss of the pyrophosphate lipid A species also caught our attention (Table 2). Indeed, the monocistronic gene *cdh* encoding a CDP-diglyceride pyrophosphatase (39) is up-regulated in the *pst* mutant K3. Cdh was shown to cleave a phosphoryl group from UDP-2,3-diacylglucosamine *in vitro*, but a distinct enzyme, LpxH, performs this function *in vivo* (2, 9). The *in vivo* function of Cdh is still unknown (8, 10, 23, 39, 41). Additionally, genes *ydhJ* and *yeiU*, which are down-regulated in the *pst* mutant K3, encode undecaprenyl pyrophosphate phosphatases that remove phosphoryl groups from inner membrane phosphate-lipid carriers. The *yeiU*



gene product was recently shown to be responsible for the synthesis of the pyrophosphate form of the lipid A, as demonstrated by Trent and colleagues (see discussion). The *yeyU* gene is located downstream of *yeyR* and forms an operon with this gene. No Pho boxes were found in the promoter region of *cdh*, *yeyR* and *ydhJ* genes. qRT-PCR experiments confirmed our microarray results (data not shown).

### **Discussion.**

In this study we show that a mutation in *pst* causes a significant decrease (66%) of the 1-pyrophosphate lipid A species in high phosphate medium (LB). This phenotype indicates that OM composition is altered in *pst* mutants (Fig. 2A and C). Furthermore, it correlates with an increased sensitivity to CAMPs. Thus, we propose that the 1-pyrophosphate of lipid A contributes to membrane cohesion. Our vancomycin sensitivity results are in accordance with the presence of cell surface perturbations in *pst* mutants. LPS structural features, such as the phosphorylation status of lipid A and the inner core, are essential for maintenance of OM integrity (4, 35, 36). Divalent cations such as  $Mg^{2+}$  bridge the phosphoryl negative charges together acting as major cohesive factors for bacterial cell surface components. Thus, alteration of the cross-bridging between LPS molecules in the *pst* mutants might diminish the overall integrity of the cell surface. This could overcome the reduction of the negative charge due to loss of phosphoryl groups (54, 55).

The PMB resistance phenotype is likely dependent in part on the

phosphorylation status of the lipid A, and the Pho regulon might play a key role in that phenomenon. Therefore, we conducted CAMP assays as well as lipid A structural analyses by TLC using bacteria from the low phosphate medium LP. In *pst* mutants, the Pho regulon is constitutively activated to mimic the induced state of wild-type strains. Indeed, phenotypes displayed in *pst* mutants were also observed in wild-type strains grown in low phosphate medium. In LP, both *pst* mutants and wild-type strains express sensitivity to CAMPs, and the amount of 1-pyrophosphate lipid A species is similar to that of the *pst* mutants grown in rich medium. This observation indicates that the Pho regulon influences the biogenesis of this lipid A species as well as the resistance to CAMPs.

Among gene candidates that could be involved in 1-pyrophosphate lipid A biosynthesis, the gene *yeiU* that is down-regulated in the *pst* mutant, as analyzed by microarray, was recently identified by Trent and colleagues to be involved in the biosynthetic origin of the lipid A 1-pyrophosphate moiety. Indeed, the YeiU (LpxT) gene product is identical to an inner membrane protein previously shown to have undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity (12), but also appears to catalyze the transfer of a phosphoryl group from the C<sub>55</sub>-undecaprenyl phosphate lipid carrier to the C-1 phosphate of the lipid A molecule (40) (Tran *et al.*, American Society for Microbiology 107<sup>TH</sup> General Meeting, Toronto, May 21<sup>ST</sup>, 2007). However, no Pho-boxes were found in the promoter region of the *yeiRU* operon. It is also possible that other candidates under the control of PhoR/PhoB participate in this modulation. As the induction of the Pho

regulon controls phosphate scavenging in phosphate-limiting environments, the cell's richer sources of phosphate, such as lipid A pyrophosphate, could provide  $P_i$  to ensure its availability for metabolism and essential phosphate-containing structures.

By *in silico* and microarray analyses, we also identified differentially expressed genes involved in LPS biosynthesis in the *pst* mutant K3. Strikingly, two genes belonging to the identified *rfaJ* operon, *rfaP* (*waapP*) and *rfaY*, possess Pho boxes in their promoter region and encode enzymes involved in the phosphorylation of the LPS inner-core (Table 2). As discussed above, loss of phosphoryl groups in the inner core of LPS can result in substantial cell surface perturbations. Thus, it is possible that Pho-dependent dephosphorylation of the LPS inner-core could influence cell surface properties. Although we did not observe any changes in O-antigen and/or ECA profiles (Fig. 3A), our microarray results suggest that molecular changes could indeed occur within the LPS structure in the *pst* mutant strains. Down-regulation of some of the ECA biosynthetic genes, such as the putative ECA polymerase *wzyE* gene, which also possesses a Pho box, is in accordance with such a hypothesis.

It is well known that covalent modifications of the lipid A are involved in resistance to CAMPs such as PMB (4, 5, 40, 50). In *E. coli* K12, covalent modifications have been observed in PMB resistant strains and in ammonium metavanadate (a non-specific inhibitor of mammalian phosphatases) –treated cells (37, 58, 60). Also, pEtN substitution was

observed in an enterohemorrhagic *E. coli* strain (EHEC; see Fig. 5A) (27). In our study, lipid A variants were observed in APEC strains but not in porcine ExPEC strains under low phosphate conditions. By comparison to lipid A TLC profiles obtained with metavanadate-treated *E. coli* K12, we hypothesized that lipid A variants observed in the K3 strain could correspond to substitutions identified by Zhou *et al.* (1999). The MALDI-TOF analyses confirmed the presence of covalent substitutions in the K3 prototype lipid A. One variant proved to be the species twice modified by pEtN on the 1 and 4'-phosphate substituents ( $m/z$ : 2043) (Fig. 6B), which was previously identified by Zhou and co-workers in their studies (1999). However, in *pst* mutants, perturbation of the OM might require more than just the presence of lipid A variants with pEtN substitutions, because, in contrast to lipid A modification by 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N), pEtN modification alone appears to have only minor effects on CAMP resistance (31, 47).

In conclusion, we demonstrate that the *pst* mutants K2 and K3 are characterized by multiple defects in virulence attributes. We demonstrate that one consequence of the *pst* mutation is a significant reduction of the lipid A 1-pyrophosphate species and that this participates in the sensitivity of the bacteria to PMB. However, other membrane modifications occur in *pst* mutants (Lamarche *et al.*, manuscript in preparation). All these alterations most likely contribute to an increased permeability to compounds, such as antibiotics or protons. This correlates with our previous report on a *pst* mutant being sensitive to acid shock and exhibiting multiple

virulence defect phenotypes (29). All together, our results strongly suggest that some *pst* phenotypes are due to the constitutive activity of the Pho regulon and that the biosynthetic pathway of the lipid A 1-pyrophosphate is influenced by the Pho regulon.

#### **Acknowledgments.**

We are grateful to Paul Bayardelle, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), for kindly providing the ECA antiserum. We thank Turlough Finan and Dick Morton (McMaster University), and Ying Fong (Université d'Ottawa) for kindly providing their *E. coli* Pho box predictions. We also thank Mahendrasingh Ramjeet, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, for his technical advice during this study. We are grateful to France Daigle for the construction of the K2 *pst* mutant. We are also grateful to Éliane Auger for her revisions of the manuscript. M. G. Lamarche was supported by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). This work was supported by grants to J. Harel from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-25120) and to Russell E. Bishop from CIHR (MOP-43886).

## References

1. **Allen, N. E., and T. I. Nicas.** 2003. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**:511-32.
2. **Babinski, K. J., S. J. Kanjilal, and C. R. Raetz.** 2002. Accumulation of the lipid A precursor UDP-2,3-diacylglucosamine in an *Escherichia coli* mutant lacking the *lpxH* gene. *J. Biol. Chem.* **277**:25947-56.
3. **Baek, J. H., and S. Y. Lee.** 2006. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**:104-9.
4. **Bishop, R. E.** 2005. Fundamentals of endotoxin structure and function. *Contrib. Microbiol.* **12**:1-27.
5. **Bishop, R. E., S. H. Kim, and A. El Zoeiby.** 2005. Role of lipid A palmitoylation in bacterial pathogenesis. *J. Endotoxin. Res.* **11**:174-80.
6. **Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-7.
7. **Breazeale, S. D., A. A. Ribeiro, and C. R. Raetz.** 2003. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. An aminotransferase (ArmB) that generates UDP-4-deoxyl-L-arabinose. *J. Biol. Chem.* **278**:24731-9.
8. **Bulawa, C. E., J. D. Hermes, and C. R. Raetz.** 1983. Chloroform-soluble nucleotides in *Escherichia coli*. Role of CDP-diglyceride in the enzymatic cytidylylation of phosphomonoester acceptors. *J. Biol. Chem.* **258**:14974-80.
9. **Bulawa, C. E., and C. R. Raetz.** 1984. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Identification and function of UDP-2,3-diacylglucosamine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**:4846-51.
10. **Bulawa, C. E., and C. R. Raetz.** 1984. Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains defective in CDP-diglyceride hydrolase. *J. Biol. Chem.* **259**:11257-64.

11. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* **63**:4924-7.
12. **El Ghachi, M., A. Derbise, A. Bouhss, and D. Mengin-Lecreulx.** 2005. Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**:18689-95.
13. **Frirdich, E., and C. Whitfield.** 2005. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the Enterobacteriaceae. *J. Endotoxin. Res.* **11**:133-44.
14. **Giacometti, A., O. Cirioni, R. Ghiselli, L. Goffi, F. Mocchegiani, A. Riva, G. Scalise, and V. Saba.** 2000. Polycationic peptides as prophylactic agents against methicillin-susceptible or methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44**:3306-9.
15. **Groisman, E. A., J. Kayser, and F. C. Soncini.** 1997. Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg<sup>2+</sup> environments. *J. Bacteriol.* **179**:7040-5.
16. **Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* **27**:1171-82.
17. **Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science.* **276**:250-3.
18. **Han, J. S., J. Y. Park, Y. S. Lee, B. Thony, and D. S. Hwang.** 1999. PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **262**:448-52.
19. **Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Isolation and characterization of adhesin-

- defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2337-45.
20. **Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt, and G. B. Cox.** 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5008-14.
  21. **Hitchcock, P. J., and T. M. Brown.** 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**:269-77.
  22. **Hoch, J. A., Silhavy, T.A.** 1995. Two-component Signal Transduction. American Society for Microbiology, Washington, DC.
  23. **Icho, T., C. E. Bulawa, and C. R. Raetz.** 1985. Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride hydrolase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**:12092-8.
  24. **Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed.** 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* **4**:249-64.
  25. **Jans, D. A., A. L. Fimmel, L. Langman, L. B. James, J. A. Downie, A. E. Senior, G. R. Ash, F. Gibson, and G. B. Cox.** 1983. Mutations in the *uncE* gene affecting assembly of the c-subunit of the adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **211**:717-26.
  26. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene.* **109**:137-41.
  27. **Kim, S. H., W. Jia, V. R. Parreira, R. E. Bishop, and C. L. Gyles.** 2006. Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157 : H7 and its association with PmrC. *Microbiology.* **152**:657-66.
  28. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-5.
  29. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the *pst*



- system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect. Immun.* **73**:4138-45.
30. **Lamarche, M. G., B. L. Wanner, S. Crépin, and J. Harel.** 2007. The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. Submitted to *FEMS Microbiology reviews* (MS # FEMSRE-07-07-0035).
  31. **Lee, H., F. F. Hsu, J. Turk, and E. A. Groisman.** 2004. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* **186**:4124-33.
  32. **Lesse, A. J., A. A. Campagnari, W. E. Bittner, and M. A. Apicella.** 1990. Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods.* **126**:109-17.
  33. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* **25**:402-8.
  34. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect. Immun.* **60**:5048-56.
  35. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:593-656.
  36. **Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**:1-32.
  37. **Nummila, K., I. Kilpelainen, U. Zahringer, M. Vaara, and I. M. Helander.** 1995. Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol. Microbiol.* **16**:271-8.
  38. **Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not

- affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or CurlI production. *Infect. Immun.* **60**:4460-7.
39. **Raetz, C. R., C. B. Hirschberg, W. Dowhan, W. T. Wickner, and E. P. Kennedy.** 1972. A membrane-bound pyrophosphatase in *Escherichia coli* catalyzing the hydrolysis of cytidine diphosphate-diglyceride. *J. Biol. Chem.* **247**:2245-7.
40. **Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent, and R. E. Bishop.** 2007. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:295-329.
41. **Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial Lipopolysaccharides: a Remarkable Family of Bioactive Macroamphiphiles. *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. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
42. **Raser, J. M., and E. K. O'Shea.** 2005. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science.* **309**:2010-3.
43. **Rida, S., J. Caillet, and J. H. Alix.** 1996. Amplification of a novel gene, *sanaA*, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:94-102.
44. **Rosenfeld, N., J. W. Young, U. Alon, P. S. Swain, and M. B. Elowitz.** 2005. Gene regulation at the single-cell level. *Science.* **307**:1962-5.
45. **Smits, W. K., O. P. Kuipers, and J. W. Veening.** 2006. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:259-71.
46. **Suziedeliene, E., K. Suziedelis, V. Garbenciute, and S. Normark.** 1999. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J. Bacteriol.* **181**:2084-93.
47. **Tamayo, R., B. Choudhury, A. Septer, M. Merighi, R. Carlson, and J. S. Gunn.** 2005. Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the

- Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide core. J. Bacteriol. **187**:3391-9.
48. **Tamayo, R., S. S. Ryan, A. J. McCoy, and J. S. Gunn.** 2002. Identification and genetic characterization of PmrA-regulated genes and genes involved in polymyxin B resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Infect. Immun. **70**:6770-8.
  49. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **76**:4350-4.
  50. **Trent, M. S.** 2004. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. Biochem. Cell. Biol. **82**:71-86.
  51. **Tsai, C. M., and C. E. Frasch.** 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **119**:115-9.
  52. **Wanner, B. L.** 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 104-128. In S. W. Silver, William (ed.), Metal ions in gene regulation. Springer.
  53. **Wanner, B. L.** 1996. 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, D.C.
  54. **Yethon, J. A., J. S. Gunn, R. K. Ernst, S. I. Miller, L. Laroche, D. Malo, and C. Whitfield.** 2000. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence *In vivo*. Infect. Immun. **68**:4485-91.
  55. **Yethon, J. A., and C. Whitfield.** 2001. Purification and characterization of WaaP from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. J. Biol. Chem. **276**:5498-504.

56. **Yi, E. C., and M. Hackett.** 2000. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. *Analyst.* **125**:651-6.
57. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, R. Morton, and T. M. Finan.** 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic. Acids. Res.* **34**:2686-97.
58. **Zhou, Z., S. Lin, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 1999. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate. *J. Biol. Chem.* **274**:18503-14.
59. **Zhou, Z., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter, S. I. Miller, and C. R. Raetz.** 2001. Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J. Biol. Chem.* **276**:43111-21.
60. **Zhou, Z., A. A. Ribeiro, and C. R. Raetz.** 2000. High-resolution NMR spectroscopy of lipid A molecules containing 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine substituents. Different attachment sites on lipid A molecules from  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ -treated *Escherichia coli* versus *kdsA* mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **275**:13542-51.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains or plasmids	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
Bacterial strains		
SM10 $\lambda$ <i>pir</i>	<i>thi-1, leu, tonA, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu, <math>\lambda</math>pir, Km<sup>r</sup></i>	Miller and Mekalanos, 1988
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB lacI<sup>r</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene
5131	Porcine ExPEC O115:K"V165":F165	Fairbrother <i>et al.</i> , 1988
K2	5131 $\Delta$ <i>pst::kan</i> , Km <sup>r</sup>	This study
CK2	K2 + pAN92, Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	This study
$\chi$ 7122	APEC O78:K80:H9 <i>gyrA</i> , Nal <sup>r</sup>	Provence and Curtiss, 1992
K3	$\chi$ 7122 $\Delta$ <i>pstCAB::kan</i>	Lamarche <i>et al.</i> , 2005
CK3	K3 + pAN92	Lamarche <i>et al.</i> , 2005
Plasmids		
pCR2.1	Cloning vector	Invitrogen
pKNG101	Suicide vector, Sm <sup>r</sup> , <i>sacB</i>	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pKNG800K	pKNG101 - $\Delta$ <i>pstCAB::kan, sacB</i> , Sm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Lamarche <i>et al.</i> , 2005
pAN92	pACYC184:: <i>pst</i> operon, Cm <sup>r</sup>	Jans <i>et al.</i> , 1983

<sup>a</sup>Kanamycin, Km<sup>r</sup>; Chloramphenicol, Cm<sup>r</sup>; Streptomycin, Sm<sup>r</sup>; Nalidixic acid, Nal<sup>r</sup>; Tetracyclin, Tet<sup>r</sup>.

Table 2: LPS-related genes identified by microarray experiments using Affymetrix GeneChip® *E. coli* Genome 2.0 Array. Also represented: some of the gene candidates selected for a potential role in the C-1 pyrophosphate defect observed in *pst* mutants. Shown are the up- or down-regulated genes in the *pst* mutant K3 compared to the wild-type strain X7122 for strains grown in high phosphate (LB) medium.

Genes	Gene functions (or putative functions)	Genomic context <sup>a</sup>	Ratio variation (Log 2)	P-value
<b>ECA biosynthesis</b>				
<i>wecD</i> /	TDP-fucosamine acetyltransferase involved in the biosynthesis of	<i>rfe-wzzE-rffEDGHCA-wzxE-rffT-wzxE-rffM</i> operon	-0,729	0,002029402
<i>rffC</i>	Enterobacterial Common Antigen (ECA).			
<i>rffH</i>	dTDP-glucose pyrophosphorylase 2 involved in the biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen (ECA).		-0,592	0,000994308
<i>rffG</i>	dTDP-glucose 4,6-dehydratase involved in the biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen (ECA).		-0,952	0,00011923
<i>wecC</i> /	UDP-N-acetyl-1-D-mannosamine dehydrogenase / UDP-N-acetyl-1-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase involved in the biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen (ECA).		-0,872	0,000205755
<i>rffD</i>				
<b>LPS-core biosynthesis</b>				
<i>rfaJ</i>	Lipopolysaccharide 1,2-glucosyltransferase. RfaJ adds the third glucose (GlcIII) to the second glucose (GlcII) of the outer core of LPS.	<i>rfaQGSSBIYZ-waaU</i> operon	-0,751	0,006725822
<b>Covalent modification of the lipid A</b>				
<i>epiA</i>	<i>S. typhimurium pmrC</i> Ortholog: phosphoethanolamine (pEtN) transferase that use phosphatidylethanolamine as a donor of pEtN for covalent modification of the lipid A.	Likely in operon with <i>basRS</i> ( <i>epiA-basRS</i> )	-0,745	0,01062587
<b>Gene candidates selected for a potential role in the C-1 pyrophosphate defect observed in <i>pst</i> mutants</b>				
<i>cdh</i>	CDP-diacylglycerol phosphotidylhydrolyase	monocistron	2,099	1,49E-05
<i>yeiU</i>	Hypothetical protein / Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	<i>yeiRU</i> operon	-0,653	0,007314727
<i>ydhJ</i>	Hypothetical protein / Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase	<i>ydhLIK</i> operon	-1,038	2,91E-05

<sup>a</sup>Pho box(es) are present in the promoter region of bolded genes.

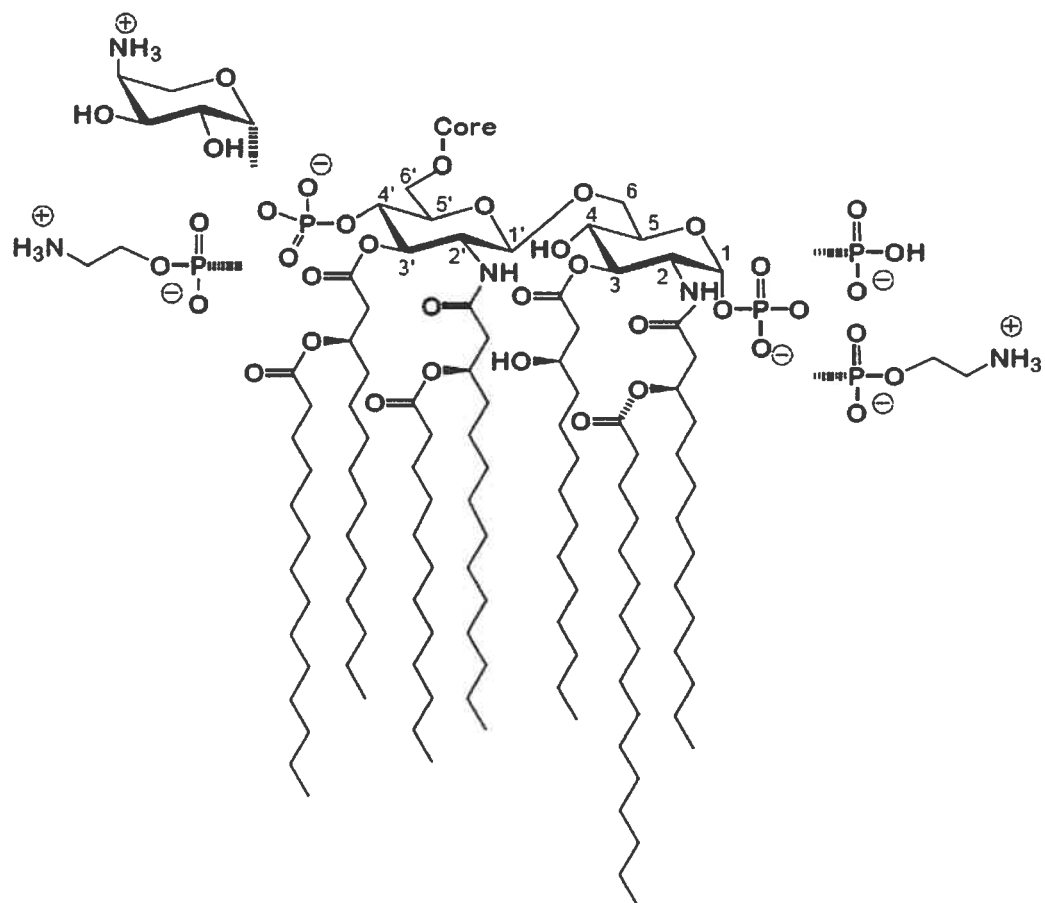


Figure 1. *E. coli* lipid A structure. Two glucosamine units are linked by a  $\beta$  1'-6 glycosidic bond to compose the lipid A backbone. Each glucosamine unit bears a phosphoryl group and two principal *R*-3- hydroxymyristoyl chains. The acyl chains of the distal glucosamine unit are further acylated with laurate and myristate. The entire structure forms a hexa-acylated 1,4'-bis-phosphate lipid A molecule. In approximately one third of the lipid A population in *E. coli*, a pyrophosphoryl group is found in position 1 of the carbon backbone instead of the single phosphoryl group. Additional covalent modifications of lipid A that can be observed under certain conditions are indicated by the dashed lines: 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N), phosphoethanolamine (pEtN), and palmitate.

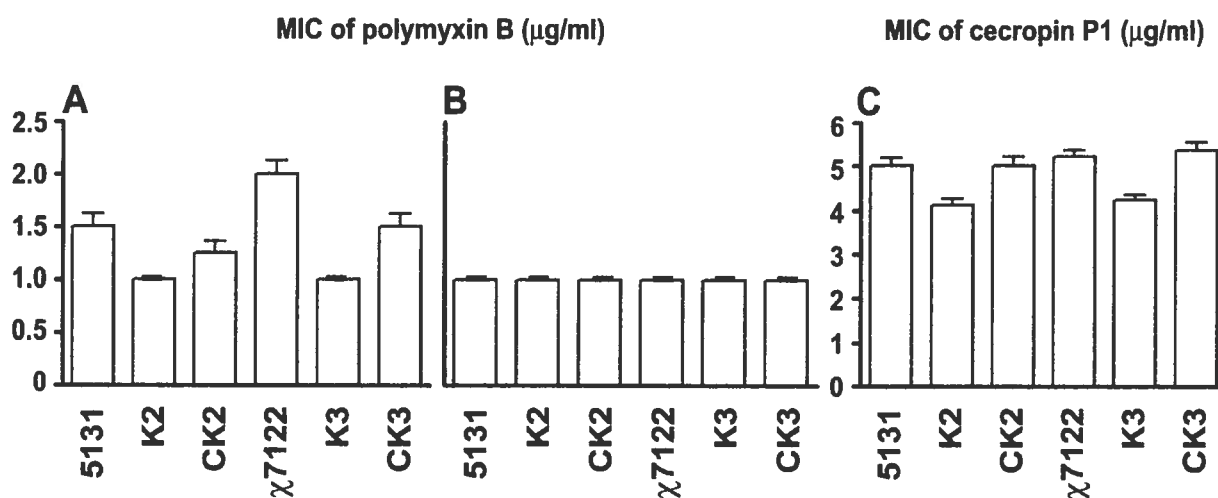


Figure 2. Cationic antimicrobial peptides (CAMPs) assay. The graphs show the minimal inhibitory concentration (MICs) of CAMPs necessary to inhibit the growth of the different strains: the ExPEC strains 5131 and  $\chi$ 7122, their isogenic *pst* mutants K2/K3 and *pst* complemented strains CK2/CK3 respectively. The MIC was considered the lowest drug concentration that reduced growth >50% compared with growth in the control well. (A) Polymyxin B MIC for strains grown in LB; (B) Polymyxin B MIC for strains grown in LP; (C) Cecropin P1 MIC for strains grown in LB. The MIC for both *pst* mutant strains, K2 and K3, was significantly lower than for their respective parent strains. No statistical differences were observed when the LP medium was used for bacterial growth.



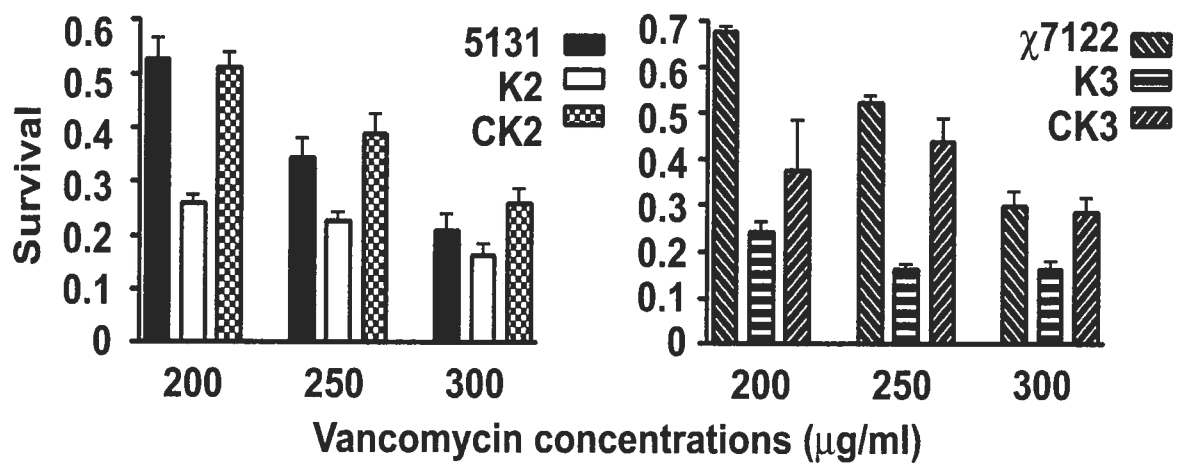


Figure 3. Vancomycin assay. The graphs show vancomycin survival of the ExPEC strains 5131 and  $\chi$ 7122 and their *pst* mutant derivatives. Vancomycin survival was calculated from the ratio of vancomycin-exposed to non-exposed cells. The survival for both *pst* mutant strains, K2 and K3, was significantly lower than for their respective parent strains. Complementation of the *pst* mutation partially restores the wild-type phenotype.

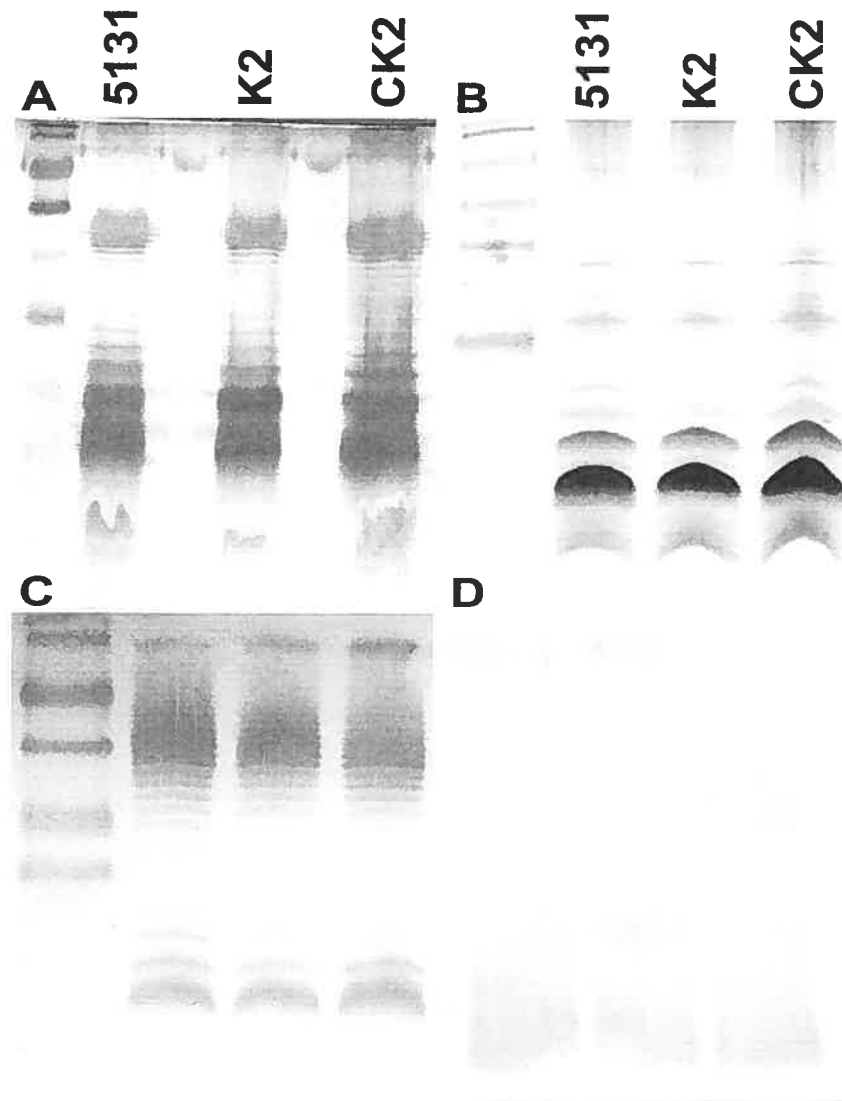


Figure 4. Lipopolysaccharide (LPS) analysis. (A) Classical SDS-PAGE (B) Tricine SDS-PAGE, which gives a higher resolution of the lipid A-core region of the LPS. Silver staining was used to reveal LPS bands. (C) Western blot analysis using either O115 or O78 antiserum and using (D) enterobacterial common antigen (ECA) antiserum. Shown are the results obtained for the ExPEC strain 5131, its isogenic *pst* mutants K2, and *pst* complemented strain CK2. Similar results were obtained with  $\chi$ 7122, K3, and CK3 (data not shown and Lamarche *et al.* 2005).

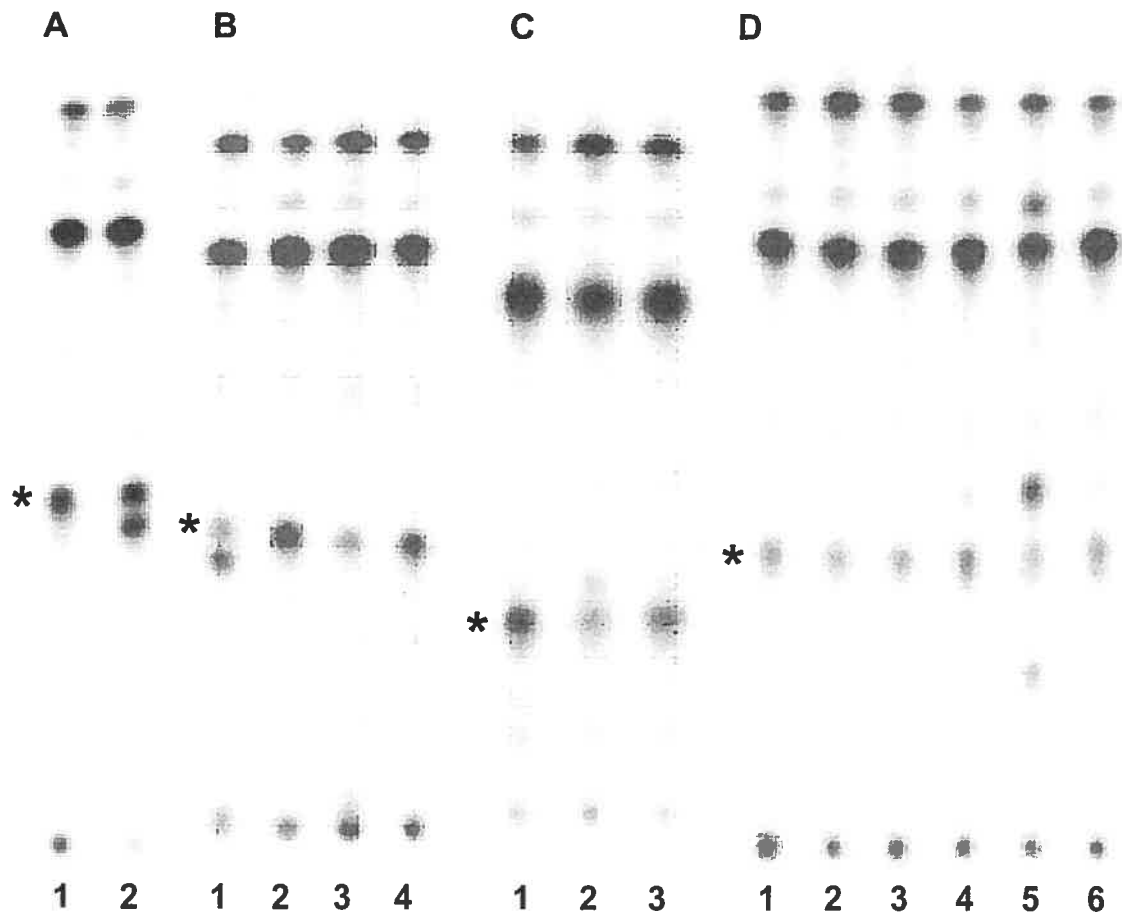


Figure 5. Analysis of radiolabeled lipid A by thin layer chromatography (TLC) of strains grown in high phosphate (LB) medium. The asterisks (\*) mark the position of the hexa-acylated 1-pyrophosphate lipid A. (A) *E. coli* K12 MC1061 (lane 1) compared to the EHEC O157:H7 strain (lane 2) as established by Kim and co-workers (2006) (27). (B) EHEC O157:H7 strain (lane 1), ExPEC strain 5131 (lane 2), the *pst* mutant K2 (lane 3), complemented *pst* mutant strain CK2 (lane 4). (C) Avian ExPEC strain  $\chi$ 7122 (lane 1), the *pst* mutant K3 (lane 2), complemented *pst* mutant strain CK3 (lane 3). (D) Analysis of radiolabeled lipid A by TLC of strains grown in low phosphate (LP) medium. ExPEC strain 5131 (lane 1), the *pst* mutant K2 (lane 2), complemented *pst* mutant strain CK2 (lane 3), avian ExPEC strain  $\chi$ 7122 (lane 4), the *pst* mutant K3 (lane 5), complemented *pst* mutant strain CK3 (lane 6).

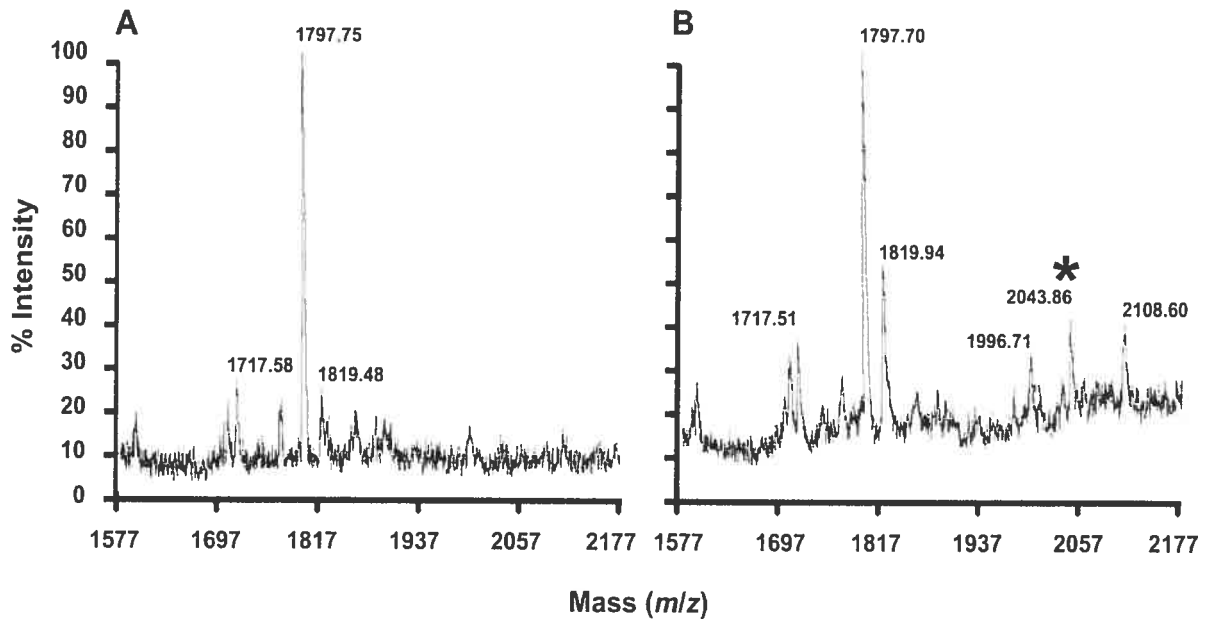


Figure 6. MALDI-TOF analyses of lipid A from the wild-type (A) and the *pst* mutant K3 (B) grown in LP medium. The prototype lipid A species (hexa-acylated 1,4'-bis-phosphate) corresponds to the major peak in both spectra, at a  $m/z$  of 1797. One variant that is visible in the K3 spectrum (\*) includes the addition of pEtN residues to each of the 1 and 4' lipid A phosphate groups A ( $m/z$ : 2043).

**ARTICLE 3**

**Growth Phase-dependent Membrane Perturbations  
Occur in an *Escherichia coli* Phosphate Specific  
Transport (Pst) Mutant Strain**

Martin G. Lamarche et Josée Harel

Manuscrit soumis dans The Journal of Bacteriology

MS No. JB01601-07

**NOTE****Growth Phase-dependent Membrane Perturbations Occur in an  
*Escherichia coli* Phosphate Specific Transport (Pst) Mutant Strain**


Martin Lamarche and Josée Harel<sup>1\*</sup>

Groupe 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

\*Author for correspondence: Josée Harel

Telephone: (450) 773 8521 ext 8233

Fax: (450) 778 8108



**Mutation in the PstSCAB inorganic phosphate transporter results in multiple sensitivity phenotypes and loss of virulence of the ExPEC strains. Our results show that a Pst mutant is subject to growth-dependent increases of the permeability of the outer membrane that are concomitant with an imbalance of fatty acids.**

The Pho regulon is the major gene network involved in phosphate acquisition and utilization when phosphate-limiting conditions occur. Pho is controlled by the two-component regulatory system PhoR/PhoB that responds to environmental inorganic phosphate ( $P_i$ ) concentration (25). The specific phosphate transport system (Pst) belongs to Pho and is encoded by the *pstSCAB-phoU* (*pst*) operon. The PstSCAB proteins form an ABC transporter involved in  $P_i$  uptake, while PhoU is required to repress Pho in high phosphate conditions (23, 26). Constitutive expression of Pho is observed when genes of the *pst* operon and the *phoR* gene are mutated (23, 24, 27). Furthermore, mutations in Pst affect survival and virulence of many bacteria (14). A *pst* mutant of the ExPEC strain 5131, the strain K2, is sensitive to both the bacteriolytic effect of serum and cationic antimicrobial peptides (CAMPs) (8, 10, 12, 13, 15). In addition, K2 was recently shown to produce less C1-pyrophosphate lipid A when high phosphate medium was used for growth (13). This phenomenon was shown to be influenced by the Pho activation state (13). This lipid A phenotype could explain only in part the K2 multiple defect phenotypes. Our previous results indicate that the outer membrane (OM) properties could be affected in K2. We undertook different experiments to resolve this issue.



The *pst* mutant K2 has an increased outer membrane permeability in early stationary phase of growth. The OM permeability was evaluated using  $\beta$ -lactamase activity dosage assays via nitrocefin permeation through the OM of intact cells. Since nitrocefin is a chromogenic substrate of  $\beta$ -lactamase, it is possible to quantify the amount of degraded nitrocefin and to correlate it with OM permeability.

Experiments were undertaken as described in a previous study but with slight modifications (2). Cells from 3-h (exponential phase of growth) or 5-h (early stationary phase of growth) LB cultures were centrifuged and resuspended in 10 mM Na-HEPES pH 7 buffer plus 5 mM  $MgCl_2$  to obtain an  $OD_{600} = 1.0$ . This suspension was divided into two samples and kept on ice. Cells from one sample were broken by sonication and 100  $\mu$ l of whole or broken cells was added to 0.65 ml of nitrocefin (purchased from Calbiochem; catalogue # 484400) solution at 0.1 mg/ml in a 1-cm spectrophotometer cuvette. The kinetics of nitrocefin hydrolysis was monitored at  $OD_{495}$ . Blank references were made by mixing 0.65 ml of the nitrocefin final solution with 100  $\mu$ l of cell supernatant, obtained by centrifuging 200  $\mu$ l of the corresponding cell suspension for 1 min.

In the exponential phase of growth, K2 has a similar OM permeability index ( $S_0/S_e$ ; see Table 1) to that of wild-type 5131. In contrast, when cells were grown to early stationary phase, K2 shows a

remarkably increased OM permeability (2.8-fold), in contrast to 5131 (Table 1). CK2 has phenotypes similar to 5131. Strikingly, for cells in the exponential phase of growth, no synergic effects between K2 lipid A phenotype (13) and OM permeability defect could explain its multiple defect phenotypes. Since OM permeability changes occur specifically in the early stationary phase of growth, some of *pst* mutant phenotypes could certainly be correlated with specific growth stages.

**The *pst* mutant K2 is sensitive to acid shock.** Acid shock of the cell cultures was carried out by using protocol A from Chang and Cronan (1999) (4). Strains were grown to the early stationary phase in LB. Prior to acid shock, viable cell counts were undertaken by spreading out dilutions of the suspension on LB agar plates (pH 7). Then, HCl (1.7 N) was rapidly added to cultures grown in LB medium until a pH of 3 was reached. The pH values were monitored by pH measurements on identical but separate cultures. After acid addition, the cultures were shaken at 37°C and at different times, aliquots were diluted and plated for colony formation on LB plates. The survival rate was calculated as the CFU determined at each time point over the initial CFU present at time zero.

The *pst* mutant K2 is sensitive to acid shock (Fig. 1). Moreover, after 4 h of acid exposure, K2 has roughly a survival rate that is 2.5-fold

decreased compared to the wild-type. However, significant differences were only observed between K2 and CK2. Indeed, complementation of the *pst* mutant K2 restores a high level of acid resistance.

**An imbalance of FAs is caused by a both mutated and over-produced Pst system for *E. coli* in the stationary phase of growth.** The acid resistance of individual strains of *E. coli* was suggested to be correlated with membrane CFA content (4). Thus, the FA composition of 5131, K2 and CK2 was determined by gas chromatography (GC) using the method described in Paisley (1999) (16).

For FA analysis, bacteria were grown either on LB or low phosphate (LP) medium agar. Approximately 40 to 50 mg (wet weight) of cells in the early stationary phase was harvested from each plate and the FA were extracted and methylated. Saponification by sodium hydroxide in methanol was performed to liberate the FA from the cellular lipids. Formation of FA methyl esters was performed by using hydrochloric acid in methanol. The FA methyl esters were identified using a Hewlett Packard GC. The reproducibility of the chromatographic technique was determined by analysis of a standard mixture within every run.

In LB, 5131 exhibits an FA profile similar to that generally observed for *E. coli* (6, 7). The FA C12:0 (lauric acid), C14:0 (myristic

acid), C16:0 (palmitic acid), and C18:1 $\omega$ 7c (cis-vaccenic) are the major FA (Table 2). When 5131 grown in LP is compared to 5131 in LB, a higher composition of cyclopropane FA (CFA) C17:0 cyclo (21.03 LP versus 17.02 LB) and a lower composition of its unsaturated FA (UFA) precursor 16:1 $\omega$ 7c (2.12 versus 3.71) is observed. A lower composition of C18:1 $\omega$ 7c (4.31 versus 6.71) is also observed (Table 2). Although the Pho regulon is derepressed in 5131 grown in LP and in K2 in LB, their FA composition differs. Also, for K2, no statistically significant differences with the FA composition of wild-type strain grown in LB could be identified because the standard deviations of the mean values are very important. Strikingly, important variations in FA composition only occur within K2 CFA and their UFA precursors. The most important divergence between FA composition of K2 and 5131 grown in LB is the relative amounts of UFA C18:1 $\omega$ 7c (8.94 for K2 versus 6.71 for 5131) and C16:1 $\omega$ 7c (4.95 versus 3.71, respectively) (Table 2). However, the percentage of CFA is similar in K2 and in 5131 when both are grown in LB. Noticeably, the FA profile of complement CK2 is different to that of 5131 in LB. Indeed, the CFA, C17:0 cyclo (14.56 for CK2 versus 17.02 for 5131) and C19:0 cyclo (5.44 versus 8.57) are lower than in 5131 and the relative amount of their respective precursors C16:1 $\omega$ 7c (8.11 versus 3.71) and C18:1 $\omega$ 7c (13.75 versus 6.71)

are higher than in 5131 grown in LB (Table 2). This indicates that the presence of the *pst* operon in multiple copies as it is carried by the medium copy vector (pACYC184) in CK2 also influences the FA composition.

We showed that in LP medium, which induces the Pho regulon in wild-type, there is an increased CFA biosynthesis concomitant with a decrease in their UFA precursors. Conversely, when Pst was overproduced by a medium copy plasmid in CK2, the percentage was decreased in CFA and increased in UFA. Moreover, in *pst* mutants grown in LB, where Pho is constitutively activated, unstable profiles of some UFA and CFA are observed. This suggests that Pst influences the FA composition in membranes, particularly UFA and CFA. Interestingly, four genes involved in FA biosynthesis were found to possess Pho boxes in their promoter regions as determined by using a Pho box prediction weight matrix (28); that is, *fabR*, *fabA*, *fadB* and *fadL*. FabA and FabB jointly produce a primary key molecule (*cis*-5-ene-3-ketododecenoyl-ACP) that is essential in subsequent steps leading to UFA biosynthesis (3, 5). FadL is an OM protein involved in transport of exogenous long chain FA (LCFA) (21, 22) and is a major player in downstream FA genes transcriptional regulation (9). Thus, in *pst* mutants, constitutive activation of PhoR/PhoB could be implicated and participate in the UFA and CFA imbalance by directly affecting FA key regulator and biosynthetic genes.

Chang and Cronan (1999) have shown that the absence of the *cfa* gene, converting UFA into CFA, rendered the bacteria more sensitive to acid shock. It is possible that the unstable profiles of UFA and CFA contribute to acid sensitivity of the K2 mutant. Indeed, a mutation in the *pst* genes could also cause a different CFA pathway regulation due to its effect on the alternative sigma factor RpoS ( $\sigma^S$ ). Indeed, the *cfa* gene is controlled, in part, by  $\sigma^S$  (4). The Pho regulon has been shown to influence  $\sigma^S$  cellular amounts by affecting the key regulatory molecule ppGpp (11, 17, 19, 20). Moreover, the *pst* operon has recently been shown to possess, within its own transcript, a regulatory sequence that enhances *rpoS* translation (18). On the other hand, the different composition of CFA and corresponding UFA in CK2 might contribute to its acid resistance.

Finally, since CFA and UFA are essential for membrane properties, and changes in their composition affect structure and function of cell surface components (1, 7), it is likely that a mutation in *pst* could cause the observed increases of OM permeability. This would contribute to the susceptibility of *pst* mutants to acid shock and to other antibacterial factors.

We thank C. Uhlund, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, for using the GC facilities and his technical advice during this

study and Céline Forget for preliminary work on GC. We also thank Turlough Finan, Dick Morton (McMaster University) and Ying Fong (Université d'Ottawa) for kindly providing their *E. coli* Pho box prediction. We are grateful to M. Mourez (Université de Montréal) for his critical reading of the manuscript and technical advice during this study. M.G. Lamarche was supported by the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT). This work was supported by grants to J. Harel from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-25120).

## References

1. **Aguilar, P. S., and D. de Mendoza.** 2006. Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol. Microbiol.* **62**:1507-14.
2. **Angus, B. L., A. M. Carey, D. A. Caron, A. M. Kropinski, and R. E. Hancock.** 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **21**:299-309.
3. **Campbell, J. W., and J. E. Cronan, Jr.** 2001. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.* **183**:5982-90.
4. **Chang, Y. Y., and J. E. Cronan, Jr.** 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**:249-59.
5. **Clark, D. P., D. DeMendoza, M. L. Polacco, and J. E. Cronan, Jr.** 1983. Beta-hydroxydecanoyl thio ester dehydrase does not catalyze a rate-limiting step in *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis. *Biochemistry.* **22**:5897-902.
6. **Cronan, J. E., Jr.** 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:202-5.
7. **Cronan, J. E., Jr., and C. O. Rock.** 1996. Biosynthesis of membrane lipids, p. 612-636. In R. C. I. F. C. Neidhardt, 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 typhimurium* Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C.
8. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* **63**:4924-7.
9. **Dirusso, C. C., and P. N. Black.** 2004. Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *J. Biol. Chem.* **279**:49563-6.
10. **Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K:-F165. *J. Gen. Microbiol.* **138**:2337-45.



11. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:373-95.
12. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect. Immun.* **73**:4138-45.
13. **Lamarche, M. G., S.-H. Kim, M. Mourez, S. Crépin, N. Bertrand, R. E. Bishop, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2007. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. Submitted to the *Journal of Bacteriology* (MS # JB01536-07).
14. **Lamarche, M. G., B. L. Wanner, S. Crépin, and J. Harel.** 2007. The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. Submitted to *FEMS Microbiology reviews* (MS # FEMSRE-07-07-0035).
15. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect. Immun.* **60**:5048-56.
16. **Paisley, R.** 1999. Cell culture techniques: Extraction procedure, p. D1-D20. In R. Paisley (ed.), *MIS Whole Cell fatty Acid Analysis by Gas Chromatography*, Training manual. Midi Inc, Newark, Delaware.
17. **Ruiz, N., and T. J. Silhavy.** 2003. Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates *rpoS* translation in an Hfq-dependent fashion. *J. Bacteriol.* **185**:5984-92.
18. **Schurdell, M. S., G. M. Woodbury, and W. R. McCleary.** 2007. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J. Bacteriol.* **189**:1150-3.
19. **Spira, B., N. Silberstein, and E. Yagil.** 1995. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for P<sub>i</sub>. *J. Bacteriol.* **177**:4053-8.
20. **Spira, B., and E. Yagil.** 1998. The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**:469-77.
21. **van den Berg, B.** 2005. The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**:401-7.
22. **van den Berg, B., P. N. Black, W. M. Clemons, Jr., and T. A. Rapoport.** 2004. Crystal structure of the long-chain fatty acid transporter FadL. *Science.* **304**:1506-9.

23. **Wanner, B. L.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**:47-54.
24. **Wanner, B. L.** 1992. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J. Bacteriol.* **174**:2053-8.
25. **Wanner, B. L.** 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 104-128. *In* S. W. Silver, William (ed.), *Metal ions in gene regulation*. Springer.
26. **Wanner, B. L.** 1996. 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, D.C.
27. **Wanner, B. L., M. R. Wilmes, and D. C. Young.** 1988. Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant by adenylyl cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon. *J. Bacteriol.* **170**:1092-102.
28. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, R. Morton, and T. M. Finan.** 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids. Res.* **34**:2686-97.

TABLE 1:  $\beta$ -Lactamase activities and nitrocefin permeation through the outer membrane of the 5131 ExPEC strain and its isogenic *pst* mutant<sup>a</sup>

Cellular phase of growth	Strain	Phenotype	$\beta$ -Lactamase activity (nmol of nitrocefin hydrolyzed/mg of cell dry weight per min)		Crypticity <sup>b</sup> (activity of broken cells/activity of whole cells)	$S_0/S_e^c$ (calculated)
			Whole cells	Sonicated broken cells		
Exponential	5131	wild-type	2.19	94.70	43.25	107.27
	K2	$\Delta pst::km^R$	2.02	96.80	48.03	138.33
	CK2	K2+pAN92	2.67	112.20	41.97	172.41
Stationary <sup>d</sup>	5131	wild-type	0.029	3.05	104.39	549.48
	K2	$\Delta pst::km^R$	0.08	3.90	48.13	195.98
	CK2	K2+pAN92	0.04	4.55	110.15	396.09

<sup>a</sup>The  $\beta$ -Lactamase activities given are the means of three biological replicates.

<sup>b</sup>The crypticity reflects the barrier function of the outer membrane. Crypticity decreases as the permeability increases.

<sup>c</sup>The ratio of the calculated medium concentration ( $S_0$ ) to the periplasmic concentration of nitrocefin ( $S_e$ ) gives an accurate measure of the outer membrane permeability, taking into account the kinetics of hydrolysis of nitrocefin in the periplasm. It can be calculated from the equation:  $S_e = (V_1 \cdot Km) / (V_{max} - V_1)$ , where  $V_1$  is the rate of hydrolysis in intact cell. Permeability increases as the ratio increases.

<sup>d</sup>Significant differences were observed between 5131/CK2 vs K2 *pst* mutant strains. One-way ANOVA followed by a multiple-comparison Tuckey test were performed.

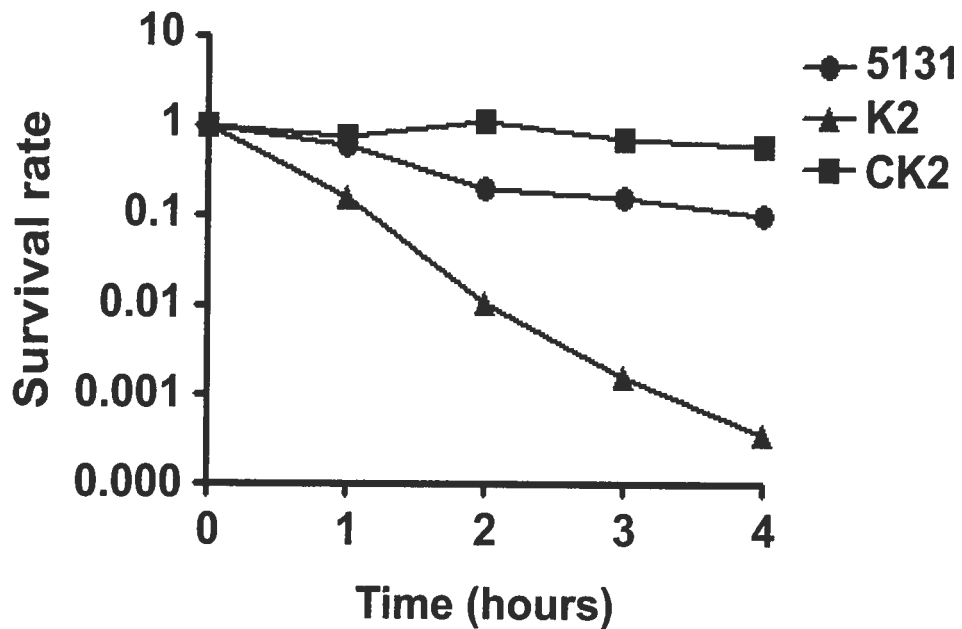
Table 2. Fatty acid profiles<sup>a</sup> of the mutant strains compared to the wild type 5131 strain obtained by gas chromatography in high (LB) or low phosphate (LP) media

Fatty acids	5131 LP	5131 LB	K2( $\Delta$ <i>pst::kan</i> ) LB	CK2(K2+ pAN92) LB
C12:0 ALDE	0.11	0.39 ± 0.56	0.51 ± 0.59	0.09
C12:0	3.64 ± 0.01	3.41 ± 0.20	3.16 ± 0.07	3.26 ± 0.05
C14:0	10.11 ± 0.02	9.08 ± 0.37	8.55 ± 0.76	7.65 ± 0.23
C16:0	39.98 ± 0.05	42.49 ± 0.99	39.83 ± 1.47	37.88 ± 0.58
C17:0 CYCLO	21.03 ± 0.32	17.02 ± 0.42	17.58 ± 1.69	*14.56 ± 0.57
C18:1 $\omega$ 7c	4.31 ± 0.30	6.71 ± 0.17	8.94 ± 2.95	*13.75 ± 0.44
C18:0	0.36	0.51 ± 0.08	0.47 ± 0.09	0.66 ± 0.46
C19:1 Iso	0.39 ± 0.01	0.32 ± 0.15	0.27 ± 0.09	0.28 ± 0.08
C19:0 CYCLO $\omega$ 8c	9.09 ± 0.09	8.57 ± 0.55	8.31 ± 2.50	*5.44 ± 0.43
C14:0 3OH/16:1 Iso <sup>b</sup>	8.28 ± 0.09	7.50 ± 0.46	7.32 ± 0.27	7.66 ± 0.19
C15:0 Iso 2OH/16:1 $\omega$ 7c <sup>b</sup>	2.12 ± 0.09	3.71 ± 0.08	4.95 ± 2.24	*8.11 ± 0.27

<sup>a</sup>Percentage of total cellular fatty acids. Each strain was analyzed on three occasions.

<sup>b</sup>Represents structurally similar fatty acids that cannot be resolved by the methods used

\*Significantly different than 5131 (LB)  $P < 0.05$ . The mean values were calculated from at least three replicates. A One-way ANOVA followed by a multiple comparison Tukey test were applied.



**Fig 1.** Acid shock resistance experiment. Survival of wild-type strain 5131 and mutant derivatives exposed to LB medium (pH 3) for various periods of time. ●, strain 5131 (wild-type); ▲, strain K2 ( $\Delta pstCAB::kan$ ); ■, strain CK2 (K2 [pAN92]). *In vitro* acid shock tests were carried out on early stationary phase cultures without habituation at 37°C. The mean values were calculated from at least three replicates. A One-way ANOVA followed by a multiple comparison Tuckey test were applied.

# **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Le régulon Pho permet à plusieurs types de bactéries de s'adapter rapidement et de survivre dans des conditions où le phosphate environnemental est rare. Comme vu précédemment, le système Pst est un régulateur du TCS PhoR/PhoB. Aussi, une mutation dans Pst cause l'activation ou la répression continue de la transcription des gènes appartenant au régulon Pho. Des études antérieures effectuées au GREMIP ont démontré qu'une mutation dans Pst, chez une souche ExPEC porcine, engendre des effets multiples qui mènent à l'avirulence de celle-ci. Notre équipe s'intéresse aux bases moléculaires qui pourraient expliquer ces phénomènes. Les données colligées dans ces études nous ont permis d'établir l'hypothèse qu'une des conséquences d'une mutation dans le système Pst est l'induction de changements au niveau de la composition des structures de la surface bactérienne. Ces structures seraient associées à certains traits de virulence. Ainsi, le présent projet visait à identifier des composantes de la surface bactérienne affectées par une mutation dans Pst. Parmi les effets recensés, nous voulions déterminer lesquels peuvent être associés à la virulence bactérienne. De plus, nous voulions vérifier si les souches ExPEC O115 et O78, d'origines porcine et aviaire respectivement, sont affectées de façon similaire par une mutation dans Pst. De façon générale, les résultats obtenus dans la présente étude nous ont permis d'établir que l'activation du régulon Pho a un effet global sur les ExPEC leur permettant non seulement de s'adapter et de survivre dans un environnement pauvre en phosphate, mais aussi de répondre adéquatement à différents stress et d'exprimer des caractéristiques associées à la virulence.

## **1. L'état d'activation continue du TCS PhoR/PhoB chez les mutants *pst***

Chez les mutants *pst*, le TCS PhoR/PhoB est activé de façon continue et ce, indépendamment de la teneur en phosphate du milieu environnant. En effet, les analyses par RT-PCR (Figure 1; article 1, page 105) confirment la surexpression du régulon Pho chez les mutants *pst* (130). Ce mouvement au niveau génique se traduit au niveau du phénotype cellulaire tel que démontré par les dosages de la phosphatase alcaline PhoA. En effet, en milieu riche en phosphate (LB), l'activité de PhoA est très élevée chez les mutants *pst* comparativement aux souches sauvages et aux mutants *pst* complémentés (Section résultats, article 1, page 84 et données non publiées). Dans la présente étude, il a été démontré qu'une mutation dans l'opéron *pst* atténue fortement la virulence des souches ExPEC 5131 et  $\chi$ 7122 et affecte certains de leurs attributs. Puisque différents systèmes peuvent permettre l'acquisition du phosphate dans les conditions étudiées, il est vraisemblable que l'activité continue du TCS PhoR/PhoB soit le déterminant majeur des phénotypes observés chez les mutants *pst*. Certains des résultats obtenus au cours de cette étude ainsi que d'autres études appuient cette affirmation.

## **2. Modèles d'infections expérimentales**

### **2.1 Les mutants *pst* isogéniques des souches ExPEC 5131 et $\chi$ 7122 sont fortement atténués pour la virulence dans des modèles expérimentaux d'infection porcine et aviaire**



Des études antérieures ont démontré que, dans un modèle expérimental d'infection porcine, un mutant *pst* isogénique de la souche ExPEC 5131 est rapidement éliminé du système vasculaire et est incapable de coloniser les organes extra-intestinaux (49). Dans l'article 1, il est démontré qu'une mutation dans *pst* chez la souche APEC  $\chi$ 7122 réduit sa capacité à causer des colibacilloses chez la volaille (Table 2; article 1, page 104). Ce mutant cause significativement moins de lésions et est moins apte à se multiplier et à persister dans un modèle expérimental d'infection chez le poulet. Cependant, contrairement au mutant *pst* porcine, le mutant *pst* aviaire est retrouvé dans la circulation systémique après 48 heures (Figure 2; article 1, page 106). Ce mutant survit donc aux étapes précoces de l'infection dans ce modèle d'infection tout en étant grandement atténué pour la virulence. Ainsi, les cinétiques d'infection des mutants *pst* porcine et aviaire sont différentes. Ceci pourrait être dû à des différences structurales et physiologiques entre ces deux mutants. Comme il sera expliqué dans la section 3, il est aussi vraisemblable que ces observations soient causées en partie par des différences entre les systèmes de défense du porc et de la volaille.

## **2.2 Autres études associant Pst à la virulence de pathogènes extra-intestinaux**

Plusieurs autres études établissent des corrélations entre la virulence et le système Pst. Cela accentue l'importance de ce système dans la virulence, non seulement des souches ExPEC à l'étude, mais aussi d'autres souches d'*E. coli* et autres espèces bactériennes. Un mutant *phoU* de la souche d'*E. coli*

uropathogène (UPEC) CFT073 perd sa capacité à coloniser le tractus urinaire de façon compétitive dans un modèle murin d'infection (UTI : « urinary tract infection ») (32). Un mutant *pst* de *Proteus mirabilis* perd aussi son plein pouvoir de virulence dans un modèle d'UTI (36). De façon similaire, un mutant *pst* d'une souche pathogène d'*Edwardsiella tarda*, un pathogène de poissons et de mammifères, est caractérisé par une capacité réduite à se multiplier dans les phagocytes et dans le sérum. Ce mutant *pst* est fortement atténué pour la virulence (234). Des études de protéomique comparative ont révélé que certaines protéines du système de sécrétion de type III (T3SS) ainsi que d'autres protéines impliquées dans la virulence sont absentes chez le mutant *pst* d'*E. tarda* (198).

### 2.3 Autres études associant Pst à la virulence de pathogènes intestinaux

De plus, le système Pst influence des mécanismes de virulence qui ne se limitent pas aux infections extra-intestinales. Par exemple, un mutant *pst* d'une souche pathogène intestinale d'*E. coli* (EPEC) produit significativement moins de lésions attachantes et effaçantes dans un modèle iléal d'infection *ex vivo* (17). Chez *Shigella flexneri*, une mutation dans *pst* réduit, de façon Pho dépendante, la capacité de ce pathogène à former des plaques sur des monocouches de cellules de Henle, une caractéristique associée à la virulence de *S. flexneri* (214). De façon similaire à ce qui est observé chez *E. tarda*, l'expression de certains gènes d'un T3SS est influencée par PhoR/PhoB chez *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (19, 143).

## **2.4 Autres études qui démontrent l'importance du TCS PhoR/PhoB pour la virulence bactérienne**

L'influence du système Pst sur la virulence doit certainement s'effectuer par le biais de l'activation continue du TCS PhoR/PhoB, puisque l'inactivation de ce dernier a des effets notables sur la virulence bactérienne. Par ailleurs, plusieurs gènes pouvant être associés à la virulence sont surexprimés chez la souche sauvage de *Vibrio cholerae* O1 par rapport à ce qui est observé chez son mutant isogénique *phoB* (124, 265, 266). De plus, ce mutant est caractérisé par une capacité diminuée à coloniser l'iléon de lapin lors d'une infection compétitive avec la souche sauvage. Les résultats de l'équipe de von Kruger (1999) sont surprenants puisque la concentration en phosphate dans l'intestin est élevée (265). Le régulon Pho devrait donc être réprimé dans ces conditions. Cette observation suggère qu'un stimulus, autre que le phosphate, rencontré dans le petit intestin pourrait agir comme inducteur du TCS PhoR/PhoB. En utilisant différentes techniques permettant d'identifier les gènes dont l'expression est nécessaire à l'infection, plusieurs études ont montré que certains des gènes appartenant au régulon Pho sont nécessaires à l'expression du plein pouvoir pathogène (Table 1; article 4, annexes, page xxxviii).

## **3. La surface bactérienne et le régulon Pho**

### **3.1 Tests de résistance au sérum et aux peptides cationiques antimicrobiens (CAMP)**

#### ***3.1.1 Les mutants *pst* sont sensibles à l'effet bactéricide du sérum***

De façon générale, chez les APEC, seulement les souches résistantes au sérum sont capables d'envahir et de survivre dans le sang dès les premières étapes de l'infection (30, 156). Cette caractéristique rend ces souches aptes à causer la septicémie et la mort chez la volaille (129). Nous avons montré que le mutant *pst* aviaire (K3) est capable de résister à l'effet bactéricide du sérum de poulet (Figure 3B; article 1, page 107) et est effectivement retrouvé dans le sang des poulets après 48 heures (Figure 2; article 1, page 106). Cependant, K3 n'est pas résistant au sérum de lapin (Figure 3A; article 1, page 107). Il est possible que des différences entre le sérum de poulet et de lapin soient responsables de ce phénomène. Puisque les composantes bactéricides du sérum de poulet sont peu connues, il est difficile d'expliquer ce phénomène (125, 131). En connaissant les mécanismes bactériolytiques du sérum poulet, il pourrait être possible d'identifier une ou des composantes de la surface bactérienne importantes pour la survie du mutant K3 dans cet environnement. Le mutant *pst* porcine (K2) est aussi sensible au sérum de lapin (données non publiées). Malgré le fait que ce mutant n'ait pas été testé *in vitro* pour la résistance au sérum de poulet et de porc, le mutant *pstC::Tnp<sub>phoA</sub>* de la souche 5131 est rapidement éliminé de la circulation systémique dans des modèles d'infection utilisant le poulet ou le porc (166). Par conséquent, K2 est vraisemblablement non résistant au sérum de poulet et de porc. Cela explique les différences entre le comportement des mutants *pst* dans leur modèle expérimental d'infection respectif, soit le résultat de différences entre le système de défense inné du porc et celui du poulet. La résistance au sérum de

poulet observée chez le mutant K3 pourrait résulter de structures de la surface bactérienne qui ne seraient pas affectées par la mutation dans *pst*.

### **3.1.2 Les mutants *pst* sont sensibles aux peptides cationiques antimicrobiens (CAMP) polymyxine B (PMB) et cécropine P1 (CP1)**

Nous avons montré qu'une mutation dans *pst* cause une augmentation de la sensibilité des souches ExPEC 5131 et  $\chi$ 7122 à la PMB et à la CP1 lorsque ces souches croissent dans un milieu riche en phosphate comme le LB (Figure 2A et C; article 2, page 143). L'une des premières étapes du mécanisme moléculaire d'action de la PMB est sa liaison au lipide A. Certaines cécropines lient aussi le lipide A (52). De plus, seulement un sixième des LPS sont liés par ces CAMP à concentration saturante, suggérant que des structures spécifiques sont ciblées par ces molécules antimicrobiennes (155).

### **3.1.3 La complémentation des mutants *pst***

La complémentation des mutants *pst* rétablit les phénotypes sauvages de résistance au sérum (Figure 3; article 1, page 107) et aux CAMP (Figure 2; article 2, page 143). Les phénotypes de sensibilité observés chez les mutants *pst* sont donc causés par l'inactivation de *pst* et non par des effets polaires sur des gènes situés en aval de l'opéron *pst*.

## **3.2 Quels facteurs peuvent expliquer ces phénotypes de sensibilité?**

Ces attributs de virulence, affectés chez les mutants *pst*, pourraient être associés à des changements à la surface bactérienne. En effet, les propriétés des différentes structures de la surface bactérienne comme la CPS, les LPS (285), les phospholipides et les OMP, contribuent à la résistance bactérienne envers les molécules du complément et des facteurs de la réponse immunitaire innée.

### **3.2.1 Modifications Pho-dépendantes de structures de la surface bactérienne**

Puisque le TCS PhoR/PhoB est activé de façon continue chez les mutants *pst*, la première question que nous nous sommes posée est : existe-t-il des précédents en ce qui concerne la modulation des structures de la surface bactérienne en réponse à un environnement pauvre en phosphate? En effet, les bactéries peuvent modifier la composition des structures de la surface bactérienne afin d'économiser le phosphate cellulaire. Par exemple, en condition de carence en phosphate, *Bacillus subtilis* induit la synthèse d'acide teichuronique, qui ne contient pas de phosphate, pour remplacer l'acide teichoïque, riche en phosphate, normalement retrouvée au sein de sa paroi cellulaire. Les gènes de biosynthèse des acides teichoïque et teichuronique sont sous le contrôle du TCS PhoR/PhoP chez *B. subtilis* (140, 141, 183). Ce TCS est homologue au TCS PhoR/PhoB d'*E.coli*. Par ailleurs, chez des mutants du système de transport spécifique du phosphate chez *S. meliloti*, des lipides ne contenant pas de phosphate remplacent les phospholipides (78). Le régulon Pho est aussi activé de façon continue chez ces mutants. Une mutation dans *phoB* rétablit le phénotype sauvage indiquant que le régulon Pho est impliqué dans le

contrôle de gènes de la biosynthèse des lipides (12, 299, 300). Finalement, en situation de carence environnementale en phosphate, PhoB induit la synthèse d'exopolysaccharides importants pour l'invasion des nodules racinaires (158, 212). Ces études appuient l'hypothèse que des structures de la surface cellulaire peuvent être modifiées chez les mutants *pst* K2 et K3. Ces changements pourraient contribuer à la sensibilité au sérum et aux CAMP observée chez ces mutants. Nous avons donc entrepris de caractériser différentes structures de la surface bactérienne.

### 3.3 Analyse des LPS et CPS

#### 3.3.1 *Les analyses SDS/Tricine-PAGE et Western blot n'ont pas révélé de différences dans les profils LPS des souches*

Les LPS composent une barrière de premier plan contre les attaques de l'environnement, incluant celles subies à l'intérieur de l'hôte. En effet, les LPS peuvent interférer dans la progression de molécules antibactériennes, comme le MAC et les CAMP, vers la ME. Ainsi, le patron d'expression des LPS ainsi que certaines propriétés immunochimiques furent tout d'abord analysés chez les souches ExPEC 5131 et  $\chi$ 7122 et leurs mutants dérivés. Nous n'avons observé aucune différence par SDS-PAGE et Western blot entre les profils LPS des souches parentales 5131 et  $\chi$ 7122, leurs mutants isogéniques et les souches mutantes complémentées (Figure 4A, B et C; article 2, page 145). Cependant, étant donné la nature de ces analyses, il n'est pas exclu que des modifications moléculaires, non détectables par ces techniques, puissent se produire au sein des LPS chez les mutants *pst*.

### 3.3.2 *Le matériel capsulaire des souches ExPEC 5131 et $\chi$ 7122*

Les souches 5131 et  $\chi$ 7122 possèdent des capsules atypiques similaires à l'antigène O (« O-like ») (Voir section 5.4, p.65). Tout comme pour les LPS, la chaîne saccharidique de cet antigène capsulaire est ancrée à la ME de la cellule bactérienne par une molécule de lipide A. Les capsules de type « O-like » peuvent masquer certains déterminants antigéniques des LPS et provoquent un encombrement stérique à la surface de la cellule. Ces capsules de faible charge négative contribuent également à la résistance aux molécules bactéricides, comme les CAMP, de par leur propriété électrostatique.

La quantité relative de CPS fut déterminée indirectement par le biais de dosages des sucres totaux (60). Nous n'avons pas observé de différence dans la quantité de sucres totaux présents chez les souches ExPEC  $\chi$ 7122 et 5131 et chez leur mutant *pst* isogénique (données non publiées). Puisque nous n'avons pas noté de différence majeure dans la quantité relative de LPS présents chez ces deux souches, les résultats du dosage des sucres totaux suggèrent qu'il n'y a pas de différence au niveau de la quantité des sucres capsulaires. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux faisant partie de l'étude effectuée par Ngeleka *et al.* (1992) dans laquelle il est montré par ELISA compétitif qu'un mutant *pst* de la souche ExPEC 5131 possède moins d'antigènes capsulaires K « V165 » (166).



### **3.3.3 Les groupements à charge négative situés dans le noyau des LPS sont importants pour la stabilité et l'intégrité membranaire**

Le statut de phosphorylation des LPS, particulièrement celui du noyau des LPS, est un déterminant pour la stabilité de la ME. Différents cations divalents, principalement le  $Mg^{2+}$  et le  $Ca^{2+}$ , lient les charges négatives des LPS et créent des pontages croisés entre ces super structures. Ainsi, les cations divalents sont des facteurs de cohésion de première importance pour les différentes structures de la surface cellulaire. Ceux-ci participent à l'efficacité de la ME comme barrière contre les protons, les détergents, les molécules bactéricides du complément, les CAMP, les antibiotiques, etc. De plus, les cations divalents bloquent les sites de liaison de différentes molécules antibactériennes, forçant ainsi leur déplacement compétitif de la surface bactérienne. La sensibilité accrue des mutants *pst* à l'effet bactéricide du sérum (Figure 3A; article 1, page 107) et aux CAMP (Figure 2; article 2, page 143) suggèrent que la mutation dans *pst* entraîne vraisemblablement des modifications de certaines structures de la surface bactérienne. Puisque les CAMP entrent en compétition avec les cations divalents pour lier les groupements phosphoryles, il est raisonnable de croire que l'abaissement du nombre de pontages croisés participe aussi aux phénotypes de sensibilité de par leur importance pour l'intégrité de la ME.

### **3.3.4 Analyses du lipide A en milieu riche en phosphate**

La polymyxine est un CAMP pour lequel les mécanismes de résistance bactériens dépendent fortement des modifications covalentes de la structure du

lipide A (27). L'analyse TLC du lipide A radiomarqué révèle qu'il y a une diminution de la quantité de lipide A hexa-acyle-1-pyrophosphate d'environ 66% chez les mutants *pst* (Figure 5B et C; article 2, page 146). Puisque cette diminution varie simultanément avec l'augmentation de la sensibilité des souches à la polymyxine (Figure 2A et C; article 2, page 143), nous proposons que le pyrophosphate du lipide A, tout comme les groupements phosphoryles du noyau des LPS, soit un facteur important pour le maintien de l'intégrité et de la cohésion de la ME. Ainsi, la diminution du nombre de pontages croisés résultant de la perte du pyrophosphate du lipide A participerait à la déstabilisation membranaire observée chez les mutants *pst*. La diminution de la charge négative à la surface cellulaire, causée par l'abaissement de la quantité de lipide A 1-pyrophosphate, résulte en la perte de cations divalents. Une mauvaise cohésion entre les molécules de lipide A est aussi susceptible de changer la dynamique des LPS et de l'antigène capsulaire de type « O-like » dans le milieu extracellulaire.

De façon similaire, chez *S. Typhimurium*, l'addition d'un groupement phosphoryle sur le premier résidu heptose du noyau interne du LPS par WaaP est essentielle pour la résistance à la polymyxine et aux molécules antimicrobiennes hydrophobes (295, 297). En support à l'importance des groupements phosphoryles pour la cohésion de la ME, les auteurs de cette étude ont suggéré que la diminution de la charge négative dans un mutant *waaP* ne compense pas pour les perturbations engendrées par la perte de cations divalents de la surface cellulaire.

### 3.3.5 *Analyses du lipide A et de la résistance à la polymyxine en milieu à faible teneur en phosphate*

L'état d'activation continue du TCS PhoR/PhoB caractérise les mutants *pst* et mime l'état d'activation de ce TCS chez des souches sauvages en conditions de carence en phosphate. Afin d'évaluer le rôle de Pho dans le phénotype de lipide A 1-pyrophosphate et de sensibilité à la PMB, nous avons décidé d'évaluer la résistance à la polymyxine et les profils du lipide A radiomarqué par TLC en utilisant un milieu de faible concentration en phosphate (LP) pour la croissance des souches.

### 3.3.6 *L'état d'activation du TCS PhoR/PhoB influence la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate et la résistance à la polymyxine*

En LP, les souches ExPEC 5131 et  $\chi$ 7122, les mutants *pst* et les mutants complémentés sont sensibles de façon équivalente à l'effet bactéricide de la polymyxine (Figure 2B; article 2, page 143). Ces souches présentent une quantité similaire de lipide A hexa-acyle-1-pyrophosphate (Figure 5D; article 2, page 146). De plus, ces phénotypes correspondent à ceux des mutants *pst* ayant crû en milieu riche en phosphate (Figure 5B et C; article 2, page 146). Ces résultats suggèrent fortement que l'état d'activation de PhoR/PhoB influence la résistance à la polymyxine *via* un processus de modulation de l'état de phosphorylation du lipide A.

### 3.3.7 *Les modifications covalentes du lipide A chez la souche K3*

Chez *E. coli*, les modifications covalentes du lipide A sont observées dans certaines conditions particulières et chez certaines souches. Par exemple, certains variants du lipide A sont présents chez des mutants résistants à la polymyxine ainsi que chez *E. coli* K12 traitée avec un inhibiteur non spécifique de phosphatases, soit le métavanadate ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) (173, 304, 305). Des substitutions peuvent aussi survenir chez les souches entérohémorragique d'*E. coli* (EHEC) comme par exemple l'ajout d'une molécule de pEtN observée chez la souche O157:H7 (121). En milieu LP, nous avons observé des variants du lipide A chez les souches APEC, mais pas chez les souches ExPEC d'origine porcine (Figure 5D; article 2, page 146). Ces variants sont prédominants chez la souche *pst* mutante K3. En comparant les profils TLC obtenus avec celui de la souche d'*E. coli* K12 traitée au  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , il a été observé que certaines des bandes pourraient correspondre entre les deux expériences. En effet, chez le mutant K3 en milieu LP, les analyses spectrométriques ont permis d'identifier une molécule de lipide A hexa-acyle-*bis*-phosphate portant deux substitutions pEtN (Figure 6; article 2, page 147). Cette molécule correspond au variant EV5 identifié par l'équipe de Zhou et ses collaborateurs (1999) (304). Elle possède un  $m/z$  de 2043 en MALDI-TOF (304). Les variants du lipide A réduisent la charge nette négative à la surface cellulaire, ce qui devrait normalement contribuer à la résistance aux CAMP. Cependant, comme expliqué dans les sections précédentes, il est vraisemblable que les perturbations membranaires se produisant chez les mutants *pst* masquent complètement le rôle biologique de ces molécules. Ces perturbations

surpasseraient aussi la diminution de l'effet d'attraction entre la surface cellulaire et les CAMP. Aussi, l'ajout de groupements pEtN sur le lipide A fut démontrée comme ayant un rôle mineur à jouer dans la résistance à la polymyxine (134, 244).

### 3.4 Le régulon Pho et le stress acide

#### 3.4.1 *Les mutants *pst* sont sensibles au choc acide*

La résistance à l'acidité est un facteur clé de la pathogénie bactérienne. Durant leur cycle de vie, les pathogènes bactériens doivent faire face à des stress causés par l'acidité. Les pathogènes entériques doivent survivre à l'acidité stomacale, alors que les pathogènes invasifs doivent aussi survivre à l'acidité des microenvironnements endosomaux. La persistance des souches ExPEC dans les lieux d'élevage est corrélée avec la capacité de ces souches à résister à un environnement acide (129, 204, 306). Dans l'estomac, les bactéries doivent survivre au moins deux heures à pH 3. Cette donnée est basée sur le temps de vidange de l'estomac chez un humain à jeûn (85). La mutation dans *pst* réduit grandement la capacité des souches 5131 et  $\chi$ 7122 à survivre à un choc acide similaire à celui rencontré dans l'estomac (Figure 1; article 3, page 164 et Figure 6; article 1, page 110). En effet, un choc acide à pH 3 sur les mutants *pst* cause rapidement leur mort. Les taux de survie sont inférieurs d'au moins 1,5 log comparativement aux souches parentales après 2 heures. La complémentation du mutant *pst* ne rétablit pas le phénotype de résistance à l'acidité de la souche APEC  $\chi$ 7122. Ceci pourrait être la conséquence d'un

dosage inapproprié des gènes *pst* portés par ce plasmide (nombre de copie moyen).

### **3.4.2 Comment Pst peut influencer la résistance à l'acidité**

#### **3.4.2.1 Régulation de gènes de résistance à l'acidité**

Il a été proposé que le TCS PhoR/PhoB réponde aussi à l'acidité externe et contrôle l'expression de gènes importants pour la résistance à l'acidité. Par exemple, le gène *asr* est impliqué dans la résistance à l'acidité et est soumis au contrôle transcriptionnelle de PhoR/PhoB (221, 222, 242, 253). *Asr* pourrait agir de façon similaire à HdeA comme puit à proton ou comme protéine chaperonne protégeant différentes protéines périplasmiques des effets délétères d'un pH acide et en empêchant l'agglomération des protéines dénaturées (75, 221). Ainsi, il est plausible que l'état d'activation continue de Pho, caractéristique des mutants *pst*, contribue à la sensibilité aux stress acides des souches ExPEC en affectant la régulation de ce type de gènes qui sont impliqués dans les mécanismes de résistance à l'acidité. De façon similaire à ce qui a été observé chez les mutants *pst* des souches ExPEC, une mutation dans *phoU* augmente la sensibilité d'une souche d'*E. coli* K-12 à des stress causés par la présence d'acides faibles (pH 4 en LB) (135). De plus, chez certaines bactéries, l'expression de l'opéron *pst* est augmentée lorsque les cellules subissent l'alcalinisation du milieu et ce, indépendamment de la concentration extra-cellulaire en phosphate (6, 70, 108). Puisque le système Pst est un régulateur du TCS PhoR/PhoB, l'activation du régulon Pho pourrait donc être

important pour une réponse à un stress acide. Le TCS PhoR/PhoB pourrait faire partie d'un circuit plus vaste impliqué dans la réponse aux stress acides.

#### *3.4.2.2 Rôle de la porine PhoE dans le phénotype de sensibilité au choc acide chez les mutants *pst**

La surface externe de la structure trimérique de PhoE possède des domaines hydrophobes qui peuvent permettre l'association de cette porine avec les groupements de tête des phospholipides et avec les LPS, ce qui favorise la stabilité de la ME (272). Cependant, la porine PhoE est aussi susceptible de contribuer à la sensibilité des mutants *Pst* au choc acide en favorisant l'entrée des protons dans la cellule. En effet, selon Rowbury et Goodson (1993), il est possible que les  $H^+$  se lient aux molécules polyanioniques transportées par PhoE (210). Étant donné les effets pléiotropiques observés chez les mutants *pst* qui sont en relation avec des attributs de la surface bactérienne, PhoE peut ne contribuer que partiellement à la sensibilité des mutants *pst* au choc acide. Dans cette situation, les défauts multiples observés chez les mutants *pst* surpasseraient l'effet seul de la présence de PhoE et contribueraient dans leur ensemble à la sensibilité à l'acidité. Des expériences sont actuellement effectuées pour confirmer cette hypothèse.

### **3.5 Membrane et perméabilité**

#### *3.5.1 Évaluation de la perméabilité membranaire*

La perméabilité de la ME est un facteur déterminant dans la capacité de diffusion des protons vers l'intérieur de la cellule. Il était donc primordial

d'évaluer la perméabilité membranaire chez les mutants *pst* puisqu'elle pouvait participer à l'effet global de sensibilité chez ces mutants. Afin d'évaluer cette possibilité, la perméabilité membranaire de cellules intactes fut jaugée par l'entremise de la diffusion d'une petite molécule hydrophile, la nitrocéfine, à travers la ME. La nitrocéfine est un substrat chromogène de la  $\beta$ -lactamase. Il est donc possible de quantifier sa dégradation par spectrométrie et d'établir le corollaire avec la perméabilité membranaire. Pour cette expérience, les souches 5131, K2 et CK2,  $\beta$ -lactamase positives, de même que des cellules en phase exponentielle de croissance ou en début de phase stationnaire de croissance furent utilisées.

#### *3.5.1.1 Le mutant *pst* K2 a une perméabilité membranaire accrue en début de phase stationnaire de croissance*

Pour les cellules en début de phase stationnaire de croissance, la perméabilité de la ME est grandement augmentée chez le mutant K2 comparativement à la souche ExPEC 5131 et à la souche mutante complémentée CK2 (Table 1; article 3. page 162). Cependant, pour les cellules en phase exponentielle de croissance, aucune différence de perméabilité entre les souches ne fut observée. Ainsi, la sensibilité des mutants *pst* aux CAMP et au sérum, qui fut évaluée en utilisant des cellules en phase exponentielle de croissance, pourrait résulter en grande partie de changements au niveau de la composition structurale des LPS. Autrement dit, il n'y a pas d'effets synergiques entre la perte du groupement pyrophosphate du lipide A et des changements de perméabilité membranaire pour des cellules en phase



exponentielle de croissance. Cependant, tel que stipulé précédemment, l'augmentation de la perméabilité de la ME chez le mutant K2 participe vraisemblablement à la sensibilisation au choc acide. En effet, des cellules ayant atteint le début de la phase stationnaire de croissance furent utilisées pour les tests de résistance à l'acidité, alors que la perméabilité membranaire est fortement augmentée chez K2.

### 3.5.2 *Les lipides membranaires*

#### 3.5.2.1 *Le système Pst influence la composition en acides gras membranaires*

Les phospholipides sont des constituants majeurs des membranes cellulaires. Les acides gras (FA) sont les composantes hydrophobes des phospholipides et déterminent, en partie, la perméabilité membranaire. De plus, chez *E. coli*, la présence de CFA favorise la résistance à l'acidité (28, 40). Ainsi, la composition en FA membranaires fut analysée par chromatographie gazeuse (GC) chez les souches 5131, K2 et CK2 en début de phase stationnaire de croissance.

Globalement, la présence d'écart-types importants pour certains FA chez K2, soit les FA cyclopropane (CFA) et les UFA précurseurs, indiquent qu'un dérèglement de la biosynthèse des lipides pourrait résulter en une variation clonale des phénotypes de FA chez cette souche. Aussi, la présence de *pst* sur un plasmide à nombre de copies moyen, chez le mutant *pst*

complémenté CK2, modifie significativement la composition de certains FA. Encore une fois, les CFA et les UFA sont les plus touchés.

#### 3.5.2.2 *Pst influence les CFA*

Les analyses GC ont démontré que le système Pst influence la composition membranaire en FA incluant les CFA (Table 2; article 3, page 163). Chez la souche ExPEC 5131, la croissance en milieu LP, induisant Pho, provoque la biosynthèse de CFA. La diminution concomitante des UFA précurseurs est aussi observée dans ces conditions. Puisque le TCS PhoR/PhoB est activé de façon continue chez les mutants *pst*, peu importe les concentrations extracellulaires en phosphate, il serait attendu que ces variations au sein des CFA et des UFA soient aussi observées chez les mutants *pst* ayant crû en milieu riche en phosphate (LB). Toutefois, chez le mutant K2, aucun changement dans le contenu en CFA ne fut observé, alors qu'une légère augmentation du contenu de leurs UFA précurseurs fut notée. Pour sa part, le mutant *pst* complémenté CK2 est caractérisé par l'augmentation significative de la production des UFA précurseurs et une diminution du contenu en CFA (Table 2; article 3, page 163).

#### 3.5.3 *Intégration sur la section 3.5*

Jia et ses collaborateurs (2004) ont démontré, en utilisant un chélateur de cations (EDTA), que la perte du  $Mg^{2+}$  et du  $Ca^{2+}$  à la surface bactérienne entraîne l'apparition de phospholipides dans le feuillet externe de la ME (112). Ce phénomène contribuerait à la sensibilité des mutants *pst* aux molécules

hydrophobes (295). Chez les mutants *pst*, tout comme il est observé chez les mutants phosphate du noyau interne des LPS, il est vraisemblable qu'il y ait apparition de domaines riches en phospholipides dans la ME.

Par ailleurs, en début de phase stationnaire de croissance, le mutant *pst* K2 est sensible au choc acide simultanément à des dérèglements dans la biogénèse et au niveau de la stabilité phénotypique des FA (Figure 1 et Table 2; article 3, pages 164 et 163). Ceci pourrait être indicateur d'un dérèglement du régulon RpoS (142). En effet, le gène *cfa* est régulé en partie par RpoS (40). Comme il sera décrit dans les prochaines sections, RpoS est influencée par l'état d'activation du TCS PhoR/PhoB par le biais de différentes voies de régulation et est par conséquent affectée chez les mutants *pst*. Il est donc possible que les mutants *pst* puissent souffrir d'une réponse RpoS illégitime durant la phase stationnaire de croissance. Ceci pourrait affecter la composition membranaire en FA et contribuer à la sensibilité des mutants *pst* au choc acide.

#### 3.5.3.1 La réponse stringente

En plus de son rôle dans la régulation des CFA, RpoS est impliquée dans la régulation de plusieurs protéines du stress comme celles impliquées dans l'entrée en phase stationnaire en situation de carence, dans les stress oxydatifs, acides, de chaleurs, etc (126, 185, 225). RpoS est aussi induite en phase stationnaire de croissance et impliquée dans l'induction de gènes de réponse aux carences en nutriments (142). Ainsi, RpoS est un facteur de première importance pour la réponse cellulaire aux stress. Une étude récente a

démontré que l'état d'activation du régulon Pho influence directement la quantité de RpoS dans la cellule. En effet, l'extrémité 3' de l'ARNm *pstCA* (transcrit *pst* clivé) interagit avec la région 5' UTR (« Untranslated sequence ») du transcrit *rpoS* et stimule l'accumulation de RpoS (219). RpoS a aussi une influence directe sur l'expression des gènes du régulon Pho (245). En effet, le régulateur RpoS réprime la transcription de plusieurs gènes du régulon Pho (*ugpB*, *phoA* et *phoE*) alors qu'il promeut celle de l'opéron *pst* (245, 246). L'état d'activation du régulon Pho influence aussi RpoS, indirectement *via* des effets modulateurs de la quantité des molécules de stress guanosine tétraphosphate (ppGpp) et polyP<sub>i</sub>.

Chez *E. coli*, la ppGpp est une molécule clé responsable d'induire des changements majeurs dans le métabolisme global de la cellule en situation de stress nutritionnels (41, 147, 180). La ppGpp est un nucléotide impliqué dans la régulation de la réponse cellulaire aux carences en acides aminés, en P<sub>i</sub> (126) et dans la réponse à des stress acides (194). En condition de carence, les enzymes RelA et SpoT catalysent la synthèse de pppGpp, hydrolysée par la suite en ppGpp par GppA. L'accumulation de ce nucléotide initie l'arrêt de l'expression des ARN ribosomiaux et des gènes codant pour des protéines tout en favorisant l'expression de gènes de biosynthèse d'acides aminés. C'est la réponse stringente en acides aminés. Le nucléotide ppGpp induit l'accumulation du facteur sigma alternatif RpoS (102). Le régulon Pho est réprimé chez les mutants *relA* et *spoT* d'*E. coli*. De plus, une mutation dans *pst* réprime la synthèse du ppGpp (231, 233). Paradoxalement, les mutants *pst* accumulent

aussi RpoS en phase exponentielle de croissance. Ce phénomène est dépendant de Hfq, un régulateur de post-transcription qui interagit avec différents ARNm, et de la présence de PhoB (213). Par ailleurs, Battesti et Bouveret (2006) ont montré que la synthèse de ppGpp peut être induite par une interaction entre ACP (« acyl carrier protein ») et SpoT (18). ACP transporterait de l'information à propos de l'état du métabolisme des FA dans la cellule (18). Il est donc possible que, chez les mutants *pst*, des perturbations de la biosynthèse des FA affectent la réponse stringente *via* un effet sur ACP.

Le polyP<sub>i</sub> est aussi une molécule synthétisée lorsque des stress environnementaux surviennent comme par exemple en situation de carence en nutriments ou en condition de grande osmolarité. Les cellules ayant des dérèglements au sein de leur réserve de polyP<sub>i</sub> sont caractérisées par une réponse inadéquate aux conditions environnementales néfastes (29). Chez certaines espèces microbiennes comme *Klebsiella aerogenes* et *Streptomyces lividans*, la polyP<sub>i</sub> kinase (Ppk), impliquée dans la biosynthèse du polyP<sub>i</sub>, est sous le contrôle du TCS PhoR/PhoB (79, 118). De façon similaire, PhoB est requise pour la régulation de l'accumulation du polyP<sub>i</sub> chez *E. coli* (164, 196). Les mutants *ppk* sont aussi incapables d'exprimer RpoS.

Ainsi, le régulon Pho influence la biosynthèse du ppGpp, du polyP<sub>i</sub> et de RpoS, tous impliqués dans la réponse aux stress. Ainsi, les variations de quantités de ces molécules effectrices survenant chez les mutants *phoR/phoB*

et *pst* pourraient engendrer une réponse aberrante à différents stress environnementaux.

### **3.6 Les mutants *pst* sont sensibles à la vancomycine**

La vancomycine est une glycoprotéine antibiotique qui interfère avec la biosynthèse du peptidoglycan en bloquant la formation des liaisons D-ala de la chaîne peptidique en croissance. Ainsi, les bactéries à Gram-négatif sont naturellement résistantes à cet antibiotique puisque la surface cellulaire bloque son accès à l'espace périplasmique. Cependant, puisque la ME des mutants *pst* est altérée de façon importante, il était vraisemblable que les molécules de vancomycine atteindraient l'espace périplasmique plus facilement que chez une souche ayant une ME intègre. Les résultats ont démontré que les mutants *pst* sont effectivement plus sensibles à l'effet bactéricide de la vancomycine comparativement aux souches parentales ExPEC (Figure 3; article 2, page 144). Ces résultats renforcent notre hypothèse initiale stipulant que les perturbations de la surface cellulaire caractérisant les mutants *pst* contribuent à ce que les molécules bactéricides de l'environnement atteignent facilement l'intérieur de la cellule bactérienne.

### **3.7 Étude de transcriptomique comparative par puce à ADN entre la souche APEC $\chi$ 7122 et K3**

#### **3.7.1 Analyses des gènes de la biosynthèse des LPS par puce à ADN**

Nous avons identifié différents gènes impliqués dans la biosynthèse des LPS qui sont exprimés de façon différentielle chez le mutant K3 (Table 2;

article 2, page 141). Le gène *rfaJ*, codant pour une glycosyl transférase catalysant l'ajout d'un troisième groupement glucose sur le deuxième glucose du noyau externe des LPS, est régulé à la baisse chez K3 comparativement à la souche parentale  $\chi$ 7122. Ce gène fait partie de l'opéron *rfaQGPSBIJYZ-waaU*. Tous les gènes de cet opéron sont impliqués dans la biosynthèse du noyau des LPS. De plus, des analyses *in silico* utilisant la matrice d'indentification de boîtes Pho élaborée par Yuan *et al.* (2006), montrent que les gènes *rfaP* et *rfaY* possèdent des boîtes Pho (300). Ces gènes codent pour des kinases impliquées dans la phosphorylation du noyau interne des LPS. L'opéron *rfaDFCL* est situé directement en amont de l'opéron *rfaQ*. Bien qu'aucun des gènes de cet opéron ne furent identifiés par notre étude de transcriptomique comparative, il est intéressant de noter que les gènes *rfaD* et *rfaL* possèdent aussi des boîtes Pho. Ces gènes codent respectivement pour une ADP-L-glycero-d-mannoheptose-6-épipimérase impliquée dans la biosynthèse du noyau des LPS et pour une ligase de l'antigène O. Ainsi, il est vraisemblable que la régulation des îlots LPS soit modulée par le régulateur PhoB dans certaines conditions d'activation du TCS PhoR/PhoB. L'opéron *rfe-wzzE-rffEDGHCA-wzxE-rffT-wzyE-rffM* est impliqué dans la biosynthèse de l'ECA et est soumis à une régulation à la baisse dans le mutant K3. Les gènes *wzyE* et *wzxE* possèdent aussi des boîtes Pho, renforçant notre hypothèse des îlots LPS. Comme présenté précédemment, les techniques SDS-PAGE et Western blot (Figure 4, article 2, page 145) ne peuvent pas détecter certains changements moléculaires qui pourraient avoir lieu au sein de la structure des LPS chez les mutants *pst*. Il est donc possible que certaines

substitutions, comme de groupements phosphates et glucoses, surviennent dans le noyau des LPS chez les mutants *pst*. Cela contribuerait au phénotype de sensibilité multiple observé chez ces mutants.

### 3.7.2 *Les gènes ayant un rôle potentiel dans la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate*

Parmi les gènes identifiés par les analyses de puce à ADN, différents gènes ont attiré notre attention de par leur rôle potentiel dans la diminution de la quantité de lipide A 1-pyrophosphate observée chez les mutants *pst* (Table 2, article 2, page 141). En effet le gène *cdh* est fortement régulé à la hausse chez le mutant K3. *Cdh* est une CDP-diglycérade pyrophosphatase (189) qui fut démontrée pour cliver le groupement phosphorylé de la molécule UDP-2,3-diacetylglucosamine *in vitro* (8, 34). Cependant, le rôle *in vivo* n'a toujours pas été décrit (33, 35, 110, 191). Les gènes *ydj* et *yeyU*, régulés à la baisse chez K3 (Table 2, article 2, page 141), codent pour des pyrophosphate phosphatases impliquées dans la déphosphorylation de substrats liés au transporteur lipidique undecaprenyl de la MI. Les molécules transportées par les undecaprenyls sont souvent des composantes structurales de la surface bactérienne.

#### 3.7.2.1 *YeyU, le facteur responsable de la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate*

Parmi ces candidats (Table 2, article 2, page 141), le gène *yeyU* qui est régulé à la baisse chez le mutant K3, code en effet pour une enzyme responsable de la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate. *YeyU* agit comme



phosphatase sur le transporteur lipidique C<sub>55</sub>-undecaprenyl pyrophosphate et transfère ensuite le groupement phosphoryle sur le phosphate situé en position 1 du lipide A. L'inactivation de *yeiU* cause la perte complète du variant 1-pyrophosphate. Le gène *yeiU* fait partie de l'opéron *yeiRU*. Cependant, aucune boîte Pho ne fut identifiée dans la région promotrice de cet opéron. Lorsque YeiU est surproduite grâce à un promoteur inductible à l'IPTG, cette enzyme a une activité C<sub>55</sub>-undecaprenyl pyrophosphate phosphatase très faible comparativement à BacA, une enzyme similaire impliquée dans la biosynthèse du peptidoglycan (28 fois plus faible) (64, 65, 250). Cela suggère que seulement un faible taux d'activité de YeiU est nécessaire pour la formation du lipide A 1-pyrophosphate. Ainsi, la diminution de l'expression de *yeiU* qui est observée chez le mutant *pst* pourrait être la cause de l'importante diminution de la quantité de lipide A 1-pyrophosphate qui est aussi observée chez ce mutant (Figure 5B et C; article 2, page 146).

### 3.7.3 Les variants du lipide A

Les analyses par puce à ADN ont démontré que les gènes codant pour le TCS BasR/S (PmrA/B) sont régulés à la hausse chez le mutant K3 comparativement à la souche parentale  $\chi$ 7122 (0,748 en Log<sub>2</sub>). Les gènes responsables de l'addition de groupement L-Ara4N et pEtN sur le lipide A sont sous la gouverne de ce TCS. Ces résultats d'analyses de transcriptomique comparative sont en accord avec les résultats des analyses du lipide A radiomarqué en plaque TLC (Figure 5D; article 2, page 146).

### 3.7.4 Analyse des gènes des voies de biosynthèse des acides gras

Certains gènes impliqués dans la biosynthèse des FA sont aussi exprimés de façon différentielle chez le mutant *pst* K3 comparativement à la souche APEC  $\chi$ 7122. Cependant, puisque les analyses par puce à ADN furent effectuées en utilisant des cellules en phase exponentielle de croissance, nous ne pouvons que recenser ces variations sans être certains qu'ils surviennent aussi chez des cellules en phase stationnaire de croissance. Ainsi, les gènes *fabB*, *fadL* et *yieE* sont exprimés à la baisse, tandis que les gènes *yccX*, *hdhA* et *cdh* sont exprimés à la hausse. FabA et FabB produisent conjointement la *cis*-5-ene-3-kétododécenoyl-ACP (ACP : acyl-carrier protein), une molécule primaire essentielle aux étapes subséquentes de la biosynthèse des UFA (37, 43). FadL est une protéine transporteur localisée dans la ME et impliquée dans l'acquisition des FA à longue chaîne (LCFA) (258, 259). FadL est essentielle pour la régulation des voies de biosynthèse des FA (56). À l'aide de la matrice d'identification de boîtes Pho élaborée par Yuan *et al.* (2006), une boîte Pho fut localisée en amont du gène *fadL* (300). Des boîtes Pho ont aussi été trouvées pour les gènes *fabA*, *fabR* et *fabB*. FabR est un régulateur important pour la biosynthèse des UFA (302). Ainsi, l'activation constitutive du TCS PhoR/PhoB pourrait causer des dérèglements dans la biosynthèse des UFA et des CFA par le biais de l'activité régulatrice de PhoB sur ces gènes. Finalement, des analyses de transcriptomique comparative seraient nécessaires afin d'établir si de telles variations géniques corroborent nos résultats GC et l'augmentation de la perméabilité membranaire.

#### 4. Les biofilms et le régulon Pho

Aucune analyse faite dans cette étude ne traite des biofilms bactériens. Cependant, puisqu'il existe aussi une relation entre le régulon Pho et la formation des biofilms et que ces derniers sont importants pour la résistance bactérienne, il est intéressant de relever brièvement cette association qui fait partie de la vision globale et actuelle définissant les mutants Pst.

Dans leurs environnements naturels, la plupart des bactéries ont une vie sessile et co-habitent avec plusieurs espèces de micro-organismes dans une structure complexe appelée biofilm. Dans un biofilm, les micro-organismes sont empêtrés dans une matrice extracellulaire de polysaccharides. Les biofilms ont un rôle important à jouer dans la pathogénie bactérienne. En effet, les biofilms peuvent servir à concentrer des FV dans un environnement précis comme le tissu d'un hôte. De plus, les biofilms favorisent les échanges génétiques incluant les gènes de virulence. Finalement, les biofilms servent aussi de réservoir favorisant la protection et la dissémination des pathogènes bactériens (50).

Une mutation dans *pst* abolit la capacité de formation de biofilms chez deux espèces bactériennes colonisatrices du rhizome, *Pseudomonas aerofaciens* et *P. fluorescens* (163). Le régulon Pho est conservé entre ces espèces bactériennes et *E. coli* (162). Monds et ses collaborateurs (2007) ont récemment démontré que chez *P. fluorescens*, la protéine RapA a une activité c-di-GMP

phosphodiesterase responsable en grande partie de l'inhibition de la formation des biofilms chez les mutants *pst* (161). En effet, la modulation Pho dépendante du c-di-GMP intracellulaire *via* l'activité de RapA, est corrélée à la fois avec une diminution de la sécrétion de l'adhésine LapA et avec une augmentation de la dissociation de cette même adhésine avec la surface bactérienne (161). De plus, chez un mutant *phoU* d'*E. coli*, l'expression des gènes de motilité est fortement augmentée (135). Cela peut aussi nuire à la formation de biofilms et au phénomène de persistance chez les mutants *pst*. Chez *E. coli*, le régulon Pho est aussi inter-relié avec les mécanismes de QS (53, 202), qui sont importants pour la formation des biofilms (179).

Mises ensemble, ces études suggèrent que le TCS PhoR/PhoB pourrait jouer un rôle important dans la virulence des bactéries *via* des liens de régulation avec les circuits de QS et de formation des biofilms.

## **CONCLUSIONS**

En conclusion, la présente recherche a démontré qu'une mutation dans *pst* chez les souches ExPEC 5131 et  $\chi$ 7122 engendre de multiples phénotypes et affecte grandement le potentiel de virulence de ces souches. Les mutants *pst* sont sensibles à différents facteurs de la défense de l'hôte qui ciblent des composantes de la surface bactérienne. En effet, les mutants *pst* sont sensibles au sérum, à l'acidité, aux CAMP et à la vancomycine (49, 130). Nous avons démontré qu'une mutation dans *pst* cause une réduction importante du nombre de molécules de lipide A hexa-acyle-1-pyrophosphate et cet abaissement participe à l'augmentation de la sensibilité aux CAMP. De plus, les résultats obtenus suggèrent fortement que les phénotypes observés chez les mutants *pst* sont la conséquence de l'état d'activation continue du TCS PhoR/PhoB et que la biosynthèse du lipide A 1-pyrophosphate est influencée par ce TCS. Il est probable que ces phénomènes soient causés en partie par la perte de cations divalents à la surface cellulaire. En effet, certaines des caractéristiques des mutants *pst* sont similaires à celles retrouvées chez des mutants phosphate du noyau interne du LPS qui sont caractérisés par des phénotypes de sensibilité multiples. Aussi, puisque le régulon Pho est impliqué dans la gestion du phosphate cellulaire en conditions de carence en phosphate, nous proposons que la ME, contenant une grande quantité de lipide A 1-pyrophosphate, puisse agir comme réserve de phosphate pouvant être utilisée si nécessaire. Le phosphate libéré pourrait alors être utilisé comme source d'énergie, comme facteur de signalisation ou comme composante structurale essentielle.

Par ailleurs, cette étude a aussi démontré qu'une mutation dans *pst* engendre des défauts dans la composition des FA membranaires. Nos résultats indiquent qu'une mutation dans *pst* affecte particulièrement les CFA et leur précurseurs UFA. Chez les mutants *pst*, les changements dans la composition de certaines structures de la surface bactérienne, comme le lipide A et les FA, sont certainement la cause de l'augmentation de la perméabilité à des composés qui sont normalement bloqués à la surface cellulaire. En plus des changements à la surface cellulaire, il est aussi possible que les mutants *pst* souffrent d'autres mauvais fonctionnements dans la régulation génique en conséquence de l'état d'activation continue du TCS PhoR/PhoB. En effet, plusieurs faits montrent des liens de corrélation entre le régulon Pho et la réponse bactérienne aux stress. Le statut cellulaire de certaines molécules impliquées dans la réponse aux stress, comme le ppGpp, polyP<sub>i</sub> et le c-di-GMP, est influencé par l'état d'activation du TCS PhoR/PhoB. Ainsi, la régulation appropriée du circuit Pho doit être nécessaire pour l'expression légitime de différents attributs de virulence incluant les composantes de la surface bactérienne, la réponse à l'acidité et la formation de biofilms (40, 77, 93, 97, 111, 126, 182, 186, 200, 201, 247). Le degré d'adaptation des cellules bactériennes vis-à-vis différents environnements est souvent associé à la capacité d'une souche à occuper différentes niches écologiques, incluant les animaux. Le TCS PhoR/PhoB est directement impliqué dans le contrôle de gènes donnant un tel avantage de *fitness*. Ainsi, le régulon Pho contribue à l'augmentation de la versatilité des bactéries et en conséquence à la virulence des pathogènes. Le comportement stochastique du régulon Pho, caractérisé par un patron d'expression génique bimodal (tout ou

rien), pourrait être un phénomène clé permettant une telle augmentation du *fitness* pour les microenvironnements rencontrés chez l'humain et les animaux.

En effet, en plus des mécanismes spécialisés permettant aux bactéries de percevoir les changements environnementaux et d'y répondre adéquatement, la diversité phénotypique à l'intérieur d'une population de cellules bactériennes génétiquement identiques contribue à la présence de cellules prédisposées, permettant ainsi une réponse immédiate à des changements environnementaux drastiques et rapides. Cette caractéristique augmente ainsi les chances de survie à de nouveaux stress. Le TCS PhoR/PhoB et le régulon Pho sont bien documentés en tant que système pour l'homéostasie cellulaire en rapport au phosphate. Cependant, l'expression des gènes PhoB dépendants est aussi caractérisée par un patron stochastique. Ce phénomène est en partie causé par l'activation de PhoB par des HK non légitimes. La boucle à rétroaction positive du régulon Pho contribue sans doute aussi à l'émergence de phénotypes multiples et stables à l'intérieur de la population bactérienne (227). Ainsi, le bruit dans l'expression génique mène à l'hétérogénéité de la population bactérienne (303). L'activation stochastique de l'expression génique est bénéfique pour les pathogènes bactériens lors d'une infection. Zhou et ses collaborateurs (2005) ont fait l'hypothèse que l'expression stochastique de l'expression génique doit permettre d'éviter l'effet d'entonnoir (d'étranglement) lors de l'infection et ainsi favoriser la sélection des « bons phénotypes » bactériens (303). Dans l'hôte, la pluralité des phénotypes bactériens permet la sélection de sous populations, dans des conditions pour



lesquelles la résistance intrinsèque de la cellule vis-à-vis différents stress est un pré-requis pour survivre.

Plusieurs études ont identifié le TCS PhoR/PhoB et les gènes du régulon Pho comme étant importants pour la virulence bactérienne. Dans plusieurs microenvironnements de l'hôte, comme l'intestin et le sang, le phosphate n'est pas limitant pour la croissance bactérienne. Ainsi, dans ces conditions, le régulon Pho devrait être inhibé. Cependant, dans des conditions de carence en phosphate, il a été démontré que la population bactérienne exhibe une expression bimodale des gènes du régulon Pho. Donc, il est possible que l'expression bimodale du régulon Pho survienne aussi dans des conditions *in vivo*, dans lesquelles la concentration en phosphate est non limitante. Cela met l'emphase sur la nécessité de la présence de cellules prédisposées (Pho activé) en relation avec l'importance de l'activation du régulon Pho durant l'infection. Dans la même optique, l'expression de certains membres du régulon Pho comme *asr* et *rapA*, en dessous du seuil d'activation normal du régulon Pho, favoriserait la sélection rapide des cellules prédisposées dans des environnements adverses. De façon similaire, l'expression stochastique de différents FV a aussi été observée chez plusieurs pathogènes (227).

Mises ensemble, les informations contenues dans cette étude nous amènent à redéfinir notre vision concernant le rôle du régulon Pho chez les bactéries. Au lieu d'être un circuit impliqué seulement dans l'homéostasie du phosphate, le régulon Pho devrait être inclus dans un réseau beaucoup plus

vaste de régulation important à la fois pour la virulence bactérienne et pour la réponse aux stress. De plus, l'expression des gènes du régulon Pho survient dans certaines conditions particulières indépendamment de la concentration environnementale en phosphate. Ceci peut être expliqué en partie par l'activation stochastique de l'expression des gènes du régulon Pho. Cependant, ceci suggère aussi que des signaux, autres que le phosphate, sont perçus par le TCS PhoR/PhoB ou que d'autres TCS contrôlent l'expression de gènes appartenant au régulon Pho. En plus du TCS PhoR/PhoB, d'autres TCS jouent un rôle dans la pathogenèse bactérienne (22).

Les TCS sont absents des cellules humaines et animales (292). Ainsi, les TCS représentent des cibles de choix pour le développement d'agents thérapeutiques (154, 236). Il a été montré que certains composés sont des inhibiteurs des TCS et possèdent une activité antibactérienne (14, 15, 81, 154). Des molécules pharmaceutiques induisant l'expression du TCS PhoR/PhoB seraient utiles comme agents thérapeutiques. Elles pourraient, en effet, compromettre la virulence bactérienne et ainsi faciliter l'élimination du pathogène par les défenses de l'hôte infecté, tout comme il a été observé pour les mutants *pst* dans les modèles expérimentaux d'infections. La génomique et la protéomique fonctionnelle donneront sans doute des opportunités afin de permettre le développement de tels composés. Finalement, le régulon Pho, incluant le système Pst, affecte plusieurs aspects de la virulence. Les changements observés chez les mutants *pst* pourraient agir de façon synergique causant une diminution de la résistance à différents facteurs de stress.

Cependant, la relation entre le régulon Pho, la réponse aux stress et la virulence a souvent une base moléculaire inconnue, soulignant ainsi l'importance de la recherche fondamentale dans ce domaine.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Aguena, M., E. Yagil, and B. Spira.** 2002. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **268**:518-24.
2. **Alexander, C., and E. T. Rietschel.** 2001. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* **7**:167-202.
3. **Allende, D., and T. J. McIntosh.** 2003. Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis. *Biochemistry* **42**:1101-8.
4. **Amemura, M., K. Makino, H. Shinagawa, A. Kobayashi, and A. Nakata.** 1985. Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **184**:241-50.
5. **Arribas-Bosacoma, R., S. K. Kim, C. Ferrer-Orta, A. G. Blanco, P. J. Pereira, F. X. Gomis-Ruth, B. L. Wanner, M. Coll, and M. Sola.** 2007. The X-ray crystal structures of two constitutively active mutants of the *Escherichia coli* PhoB receiver domain give insights into activation. *J Mol Biol* **366**:626-41.
6. **Atalla, A., and W. Schumann.** 2003. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* is specifically induced by alkali stress. *J Bacteriol* **185**:5019-22.
7. **Avison, M. B., R. E. Horton, T. R. Walsh, and P. M. Bennett.** 2001. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem* **276**:26955-61.
8. **Babinski, K. J., S. J. Kanjilal, and C. R. Raetz.** 2002. Accumulation of the lipid A precursor UDP-2,3-diacylglucosamine in an *Escherichia coli* mutant lacking the *lpxH* gene. *J Biol Chem* **277**:25947-56.
9. **Bachhawat, P., G. V. Swapna, G. T. Montelione, and A. M. Stock.** 2005. Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure* **13**:1353-63.
10. **Bader, M. W., W. W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J. G. Frye, M. McClelland, F. C. Fang, and S. I. Miller.** 2003. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **50**:219-30.
11. **Baek, J. H., and S. Y. Lee.** 2006. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **264**:104-9.
12. **Bardin, S., S. Dan, M. Osteras, and T. M. Finan.** 1996. A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**:4540-7.
13. **Barondess, J. J., and J. Beckwith.** 1995. *bor* gene of phage lambda, involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J Bacteriol* **177**:1247-53.
14. **Barrett, J. F., R. M. Goldschmidt, L. E. Lawrence, B. Foleno, R. Chen, J. P. Demers, S. Johnson, R. Kanojia, J. Fernandez, J. Bernstein, L. Licata, A. Donetz, S. Huang, D. J. Hlasta, M. J. Macielag, K. Ohemeng, R. Frechette, M. B. Frosco, D. H. Klaubert, J. M. Whiteley, L. Wang, and J. A. Hoch.** 1998. Antibacterial agents

- that inhibit two-component signal transduction systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5317-22.
15. **Barrett, J. F., and J. A. Hoch.** 1998. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1529-36.
  16. **Barua, S., T. Yamashino, T. Hasegawa, K. Yokoyama, K. Torii, and M. Ohta.** 2002. Involvement of surface polysaccharides in the organic acid resistance of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **43**:629-40.
  17. **Battison, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques, and J. Harel.** 2003. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**:4516-25.
  18. **Battesti, A., and E. Bouveret.** 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol Microbiol* **62**:1048-63.
  19. **Baxter, M. A., and B. D. Jones.** 2005. The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**:1377-85.
  20. **Beard, S. J., R. Hashim, G. Wu, M. R. Binet, M. N. Hughes, and R. K. Poole.** 2000. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **184**:231-5.
  21. **Bearson, S., B. Bearson, and J. W. Foster.** 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **147**:173-80.
  22. **Beier, D., and R. Gross.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**:143-52.
  23. **Bhagwat, A. A., and M. Bhagwat.** 2004. Comparative analysis of transcriptional regulatory elements of glutamate-dependent acid-resistance systems of *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* **234**:139-47.
  24. **Bishop, R. E., H. S. Gibbons, T. Guina, M. S. Trent, S. I. Miller, and C. R. Raetz.** 2000. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *Embo J* **19**:5071-80.
  25. **Bishop, R. E., S. H. Kim, and A. El Zoeiby.** 2005. Role of lipid A palmitoylation in bacterial pathogenesis. *J Endotoxin Res* **11**:174-80.
  26. **Blanco, A. G., M. Sola, F. X. Gomis-Ruth, and M. Coll.** 2002. Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (Camb)* **10**:701-13.
  27. **Breazeale, S. D., A. A. Ribeiro, and C. R. Raetz.** 2003. Origin of lipid A species modified with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose in polymyxin-resistant mutants of *Escherichia coli*. An aminotransferase (ArnB) that generates UDP-4-deoxyl-L-arabinose. *J Biol Chem* **278**:24731-9.
  28. **Brown, J. L., T. Ross, T. A. McMeekin, and P. D. Nichols.** 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of

- cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int J Food Microbiol* **37**:163-73.
29. **Brown, M. R., and A. Kornberg.** 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16085-7.
  30. **Brown, P. K., and R. Curtiss, 3rd.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11149-54.
  31. **Bruant, G., C. Maynard, S. Bekal, I. Gaucher, L. Masson, R. Brousseau, and J. Harel.** 2006. Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **72**:3780-4.
  32. **Buckles, E. L., X. Wang, C. V. Lockett, D. E. Johnson, and M. S. Donnberg.** 2006. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology* **152**:153-60.
  33. **Bulawa, C. E., J. D. Hermes, and C. R. Raetz.** 1983. Chloroform-soluble nucleotides in *Escherichia coli*. Role of CDP-diglyceride in the enzymatic cytidylylation of phosphomonoester acceptors. *J Biol Chem* **258**:14974-80.
  34. **Bulawa, C. E., and C. R. Raetz.** 1984. The biosynthesis of gram-negative endotoxin. Identification and function of UDP-2,3-diacetylglucosamine in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **259**:4846-51.
  35. **Bulawa, C. E., and C. R. Raetz.** 1984. Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains defective in CDP-diglyceride hydrolase. *J Biol Chem* **259**:11257-64.
  36. **Burall, L. S., J. M. Harro, X. Li, C. V. Lockett, S. D. Himpsl, J. R. Hebel, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2004. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect Immun* **72**:2922-38.
  37. **Campbell, J. W., and J. E. Cronan, Jr.** 2001. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the fabB fatty acid biosynthetic gene. *J Bacteriol* **183**:5982-90.
  38. **Caroff, M., and D. Karibian.** 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* **338**:2431-47.
  39. **Castanie-Cornet, M. P., T. A. Penfound, D. Smith, J. F. Elliott, and J. W. Foster.** 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:3525-35.
  40. **Chang, Y. Y., and J. E. Cronan, Jr.** 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**:249-59.
  41. **Chatterji, D., and A. K. Ojha.** 2001. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**:160-5.
  42. **Cherifi, A., M. Contrepolis, B. Picard, P. Goulet, I. Orskov, and F. Orskov.** 1994. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup

- O78 isolates from human and animal infections. *J Clin Microbiol* **32**:1197-202.
43. **Clark, D. P., D. DeMendoza, M. L. Polacco, and J. E. Cronan, Jr.** 1983. Beta-hydroxydecanoyl thio ester dehydrase does not catalyze a rate-limiting step in *Escherichia coli* unsaturated fatty acid synthesis. *Biochemistry* **22**:5897-902.
  44. **Cole, A. M., Ganz, T.** 2005. Defensins and Other Antimicrobial Peptides: Innate Defense of Mucosal Surfaces, p. 17-34. *In* J. P. Nataro, Cohen, P.S., Mobley, H.L.T., Weiser, J.N. (ed.), *Colonization of Mucosal Surface*. ASM Press, Washington, D.C.
  45. **Cox, G. B., D. Webb, J. Godovac-Zimmermann, and H. Rosenberg.** 1988. Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *J Bacteriol* **170**:2283-6.
  46. **Cozzone, A. J.** 2005. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**:198-213.
  47. **Cronan, J. E., Jr., and C. O. Rock.** 1996. Biosynthesis of membrane lipids, p. 612-636. *In* R. C. I. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umberger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C.
  48. **Cross, A. S., K. S. Kim, D. C. Wright, J. C. Sadoff, and P. Gemski.** 1986. Role of lipopolysaccharide and capsule in the serum resistance of bacteremic strains of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **154**:497-503.
  49. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect Immun* **63**:4924-7.
  50. **Davey, M. E., and A. O'Toole G.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**:847-67.
  51. **De Biase, D., A. Tramonti, F. Bossa, and P. Visca.** 1999. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol Microbiol* **32**:1198-211.
  52. **De Lucca, A. J., T. J. Jacks, and K. A. Brogden.** 1995. Binding between lipopolysaccharide and cecropin A. *Mol Cell Biochem* **151**:141-8.
  53. **DeLisa, M. P., C. F. Wu, L. Wang, J. J. Valdes, and W. E. Bentley.** 2001. DNA microarray-based identification of genes controlled by autoinducer 2-stimulated quorum sensing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:5239-47.
  54. **Dezfulian, H., Crost, C., Harel, J.** 2001. A mini review on F165 fimbriae. *Recent Res Devel Microbiology* **5**:123-137.



55. **Diez-Gonzalez, F., and Y. Karaibrahimoglu.** 2004. Comparison of the glutamate-, arginine- and lysine-dependent acid resistance systems in *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol* **96**:1237-44.
56. **Dirusso, C. C., and P. N. Black.** 2004. Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *J Biol Chem* **279**:49563-6.
57. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-52.
58. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**:4145-54.
59. **Dressman, J. B., R. R. Berardi, L. C. Dermentzoglou, T. L. Russell, S. P. Schmaltz, J. L. Barnett, and K. M. Jarvenpaa.** 1990. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm Res* **7**:756-61.
60. **Dubois, M., K. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith.** 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* **168**:167.
61. **Dunkley, E. A., Jr., A. A. Guffanti, S. Clejan, and T. A. Krulwich.** 1991. Facultative alkaliphiles lack fatty acid desaturase activity and lose the ability to grow at near-neutral pH when supplemented with an unsaturated fatty acid. *J Bacteriol* **173**:1331-4.
62. **Edelman, S., S. Leskela, E. Ron, J. Apajalahti, and T. K. Korhonen.** 2003. *In vitro* adhesion of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain to surfaces of the chicken intestinal tract and to ileal mucus. *Vet Microbiol* **91**:41-56.
63. **Eguchi, Y., and R. Utsumi.** 2005. A novel mechanism for connecting bacterial two-component signal-transduction systems. *Trends Biochem Sci* **30**:70-2.
64. **El Ghachi, M., A. Bouhss, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx.** 2004. The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem* **279**:30106-13.
65. **El Ghachi, M., A. Derbise, A. Bouhss, and D. Mengin-Lecreulx.** 2005. Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:18689-95.
66. **Ellison, D. W., and W. R. McCleary.** 2000. The unphosphorylated receiver domain of PhoB silences the activity of its output domain. *J Bacteriol* **182**:6592-7.
67. **Eppens, E. F., N. Nouwen, and J. Tommassen.** 1997. Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *Embo J* **16**:4295-301.

68. **Eppens, E. F., N. Saint, P. Van Gelder, R. van Boxtel, and J. Tommassen.** 1997. Role of the constriction loop in the gating of outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. FEBS Lett **415**:317-20.
69. **Fairbrother, J. M., A. Broes, M. Jacques, and S. Lariviere.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. Am J Vet Res **50**:1029-36.
70. **Fischer, R. J., S. Oehmcke, U. Meyer, M. Mix, K. Schwarz, T. Fiedler, and H. Bahl.** 2006. Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. J Bacteriol **188**:5469-78.
71. **Fisher, S. L., W. Jiang, B. L. Wanner, and C. T. Walsh.** 1995. Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB. Characterization and identification of a VanS domain that inhibits activation of PhoB. J Biol Chem **270**:23143-9.
72. **Foley, S. L., S. M. Horne, C. W. Giddings, M. Robinson, and L. K. Nolan.** 2000. Iss from a virulent avian *Escherichia coli*. Avian Dis **44**:185-91.
73. **Foster, J. W.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. Nat Rev Microbiol **2**:898-907.
74. **Foster, J. w.** 2000. Microbial responses to acid stress, p. 99-115. In G. Storz, Hengge-Aronis, R. (ed.), Bacterial stress responses. ASM Press, Washington, D.C.
75. **Gajiwala, K. S., and S. K. Burley.** 2000. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. J Mol Biol **295**:605-12.
76. **Ganz, T.** 2004. Antimicrobial polypeptides. J Leukoc Biol **75**:34-8.
77. **Gaynor, E. C., D. H. Wells, J. K. MacKichan, and S. Falkow.** 2005. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. Mol Microbiol **56**:8-27.
78. **Geiger, O., V. Rohrs, B. Weissenmayer, T. M. Finan, and J. E. Thomas-Oates.** 1999. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. Mol Microbiol **32**:63-73.
79. **Ghorbel, S., J. Kormanec, A. Artus, and M. J. Virolle.** 2006. Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24. J Bacteriol **188**:677-86.
80. **Gibbons, H. S., S. R. Kalb, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2005. Role of Mg<sup>2+</sup> and pH in the modification of *Salmonella* lipid A after endocytosis by macrophage tumour cells. Mol Microbiol **55**:425-40.
81. **Gilmour, R., J. E. Foster, Q. Sheng, J. R. McClain, A. Riley, P. M. Sun, W. L. Ng, D. Yan, T. I. Nicas, K. Henry, and M. E. Winkler.** 2005. New class of competitive inhibitor of bacterial histidine kinases. J Bacteriol **187**:8196-200.
82. **Goldman, R. C., K. Joiner, and L. Leive.** 1984. Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide,

- lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. *J Bacteriol* **159**:877-82.
83. **Goldman, R. C., D. White, F. Orskov, I. Orskov, P. D. Rick, M. S. Lewis, A. K. Bhattacharjee, and L. Leive.** 1982. A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. *J Bacteriol* **151**:1210-21.
  84. **Goodson, M., and R. J. Rowbury.** 1991. RecA-independent resistance to irradiation with u.v. light in acid-habituated *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* **70**:177-80.
  85. **Gorden, J., and P. L. Small.** 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun* **61**:364-7.
  86. **Grangeasse, C., A. J. Cozzone, J. Deutscher, and I. Mijakovic.** 2007. Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci* **32**:86-94.
  87. **Gross, W. B.** 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, p. 237-259. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and man. CAB Intl., Wallingford, United Kingdom.
  88. **Gunn, J. S., K. B. Lim, J. Krueger, K. Kim, L. Guo, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* **27**:1171-82.
  89. **Guo, L., K. B. Lim, J. S. Gunn, B. Bainbridge, R. P. Darveau, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1997. Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes *phoP-phoQ*. *Science* **276**:250-3.
  90. **Guo, L., K. B. Lim, C. M. Poduje, M. Daniel, J. S. Gunn, M. Hackett, and S. I. Miller.** 1998. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* **95**:189-98.
  91. **Haldimann, A., L. L. Daniels, and B. L. Wanner.** 1998. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon. *J Bacteriol* **180**:1277-86.
  92. **Haldimann, A., M. K. Prahalad, S. L. Fisher, S. K. Kim, C. T. Walsh, and B. L. Wanner.** 1996. Altered recognition mutants of the response regulator PhoB: a new genetic strategy for studying protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14361-6.
  93. **Hammer, B. K., and M. S. Swanson.** 1999. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* **33**:721-31.
  94. **Han, J. S., J. Y. Park, Y. S. Lee, B. Thony, and D. S. Hwang.** 1999. PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **262**:448-52.
  95. **Hancock, R. E.** 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* **349**:418-22.
  96. **Hancock, R. E., and G. Diamond.** 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* **8**:402-10.

97. **Haralalka, S., S. Nandi, and R. K. Bhadra.** 2003. Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors. *J Bacteriol* **185**:4672-82.
98. **Harel, J., J. Fairbrother, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore.** 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet Microbiol* **38**:139-55.
99. **Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K:-F165. *J Gen Microbiol* **138**:2337-45.
100. **Harris, R. M., D. C. Webb, S. M. Howitt, and G. B. Cox.** 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**:5008-14.
101. **Helander, I. M., I. Kilpelainen, and M. Vaara.** 1994. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*: a <sup>31</sup>P-NMR study. *Mol Microbiol* **11**:481-7.
102. **Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:373-95.
103. **Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn, and J. L. Slonczewski.** 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:3978-81.
104. **Hoch, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**:165-70.
105. **Hoch, J. A., Silhavy, T.A.** 1995. Two-component Signal Transduction. American Society for Microbiology, Washington, DC.
106. **Hoffer, S. M., P. Schoondermark, H. W. van Veen, and J. Tommassen.** 2001. Activation by gene amplification of *pitB*, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **183**:4659-63.
107. **Hoffer, S. M., and J. Tommassen.** 2001. The phosphate-binding protein of *Escherichia coli* is not essential for P(i)-regulated expression of the Pho regulon. *J Bacteriol* **183**:5768-71.
108. **Hornback, T., M. Jakobsen, J. Dynesen, and A. K. Nielsen.** 2004. Global transcription profiles and intracellular pH regulation measured in *Bacillus licheniformis* upon external pH upshifts. *Arch Microbiol* **182**:467-74.
109. **Horne, S. M., S. J. Pfaff-McDonough, C. W. Giddings, and L. K. Nolan.** 2000. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **44**:179-84.
110. **Icho, T., C. E. Bulawa, and C. R. Raetz.** 1985. Molecular cloning and sequencing of the gene for CDP-diglyceride hydrolase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **260**:12092-8.
111. **Jain, V., M. Kumar, and D. Chatterji.** 2006. ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol* **44**:1-10.

112. **Jia, W., A. El Zoeiby, T. N. Petruzziello, B. Jayabalasingham, S. Seyedirashti, and R. E. Bishop.** 2004. Lipid trafficking controls endotoxin acylation in outer membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**:44966-75.
113. **Joiner, K. A., N. Grossman, M. Schmetz, and L. Leive.** 1986. C3 binds preferentially to long-chain lipopolysaccharide during alternative pathway activation by *Salmonella montevideo*. *J Immunol* **136**:710-5.
114. **Jung, I. L., and I. G. Kim.** 2003. Polyamines and glutamate decarboxylase-based acid resistance in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**:22846-52.
115. **Kato, A., and E. A. Groisman.** 2004. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. *Genes Dev* **18**:2302-13.
116. **Kato, A., T. Latifi, and E. A. Groisman.** 2003. Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4706-11.
117. **Kato, A., A. Y. Mitrophanov, and E. A. Groisman.** 2007. A connector of two-component regulatory systems promotes signal amplification and persistence of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
118. **Kato, J., T. Yamamoto, K. Yamada, and H. Ohtake.** 1993. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. *Gene* **137**:237-42.
119. **Katz, M., H. Tsubery, S. Kolusheva, A. Shames, M. Fridkin, and R. Jelinek.** 2003. Lipid binding and membrane penetration of polymyxin B derivatives studied in a biomimetic vesicle system. *Biochem J* **375**:405-13.
120. **Kemper, C., and J. P. Atkinson.** 2007. T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* **7**:9-18.
121. **Kim, S. H., W. Jia, V. R. Parreira, R. E. Bishop, and C. L. Gyles.** 2006. Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157 : H7 and its association with PmrC. *Microbiology* **152**:657-66.
122. **Kim, S. K., M. R. Wilmes-Riesenberg, and B. L. Wanner.** 1996. Involvement of the sensor kinase EnvZ in the *in vivo* activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol* **22**:135-47.
123. **Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga, and H. Mori.** 2005. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**:291-9.
124. **Kocan, M., S. Schaffer, T. Ishige, U. Sorger-Herrmann, V. F. Wendisch, and M. Bott.** 2006. Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188**:724-32.

125. **Koch, C.** 1987. Complement system in avian species, p. 43-55. *In* A. Toivanen, Toivanen, P (ed.), *Avian Immunology: Basis and Practice*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
126. **Kornberg, A., N. N. Rao, and D. Ault-Riche.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* **68**:89-125.
127. **Kox, L. F., M. M. Wosten, and E. A. Groisman.** 2000. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *Embo J* **19**:1861-72.
128. **La Ragione, R. M., W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2000. 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* **49**:327-38.
129. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**:27-35.
130. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* **73**:4138-45.
131. **Laursen, S. B., and O. L. Nielsen.** 2000. Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Dev Comp Immunol* **24**:85-101.
132. **Law, J. H.** 1971. Biosynthesis of cyclopropane rings. *Acc. Chem. Res.* **4**:199-203.
133. **Lease, R. A., D. Smith, K. McDonough, and M. Belfort.** 2004. The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:6179-85.
134. **Lee, H., F. F. Hsu, J. Turk, and E. A. Groisman.** 2004. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **186**:4124-33.
135. **Li, Y., and Y. Zhang.** 2007. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:2092-9.
136. **Lin, J., I. S. Lee, J. Frey, J. L. Slonczewski, and J. W. Foster.** 1995. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**:4097-104.
137. **Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett, and J. W. Foster.** 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **62**:3094-100.
138. **Liu, J., Y. Lou, H. Yokota, P. D. Adams, R. Kim, and S. H. Kim.** 2005. Crystal structure of a PhoU protein homologue: a new class of metalloprotein containing multinuclear iron clusters. *J Biol Chem* **280**:15960-6.

139. **Liu, N., and A. H. Delcour.** 1998. Inhibitory effect of acidic pH on OmpC porin: wild-type and mutant studies. *FEBS Lett* **434**:160-4.
140. **Liu, W., S. Eder, and F. M. Hulett.** 1998. Analysis of *Bacillus subtilis* *tagAB* and *tagDEF* expression during phosphate starvation identifies a repressor role for PhoP-P. *J Bacteriol* **180**:753-8.
141. **Liu, W., and F. M. Hulett.** 1998. 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* **144**:1443-50.
142. **Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky, and R. Sparling.** 1998. Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**:707-17.
143. **Lucas, R. L., C. P. Lostroh, C. C. DiRusso, M. P. Spector, B. L. Wanner, and C. A. Lee.** 2000. Multiple factors independently regulate *hila* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **182**:1872-82.
144. **Ma, Z., S. Gong, H. Richard, D. L. Tucker, T. Conway, and J. W. Foster.** 2003. GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**:1309-20.
145. **Ma, Z., N. Masuda, and J. W. Foster.** 2004. Characterization of EvgAS-YdeO-GadE branched regulatory circuit governing glutamate-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7378-89.
146. **Ma, Z., H. Richard, D. L. Tucker, T. Conway, and J. W. Foster.** 2002. Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol* **184**:7001-12.
147. **Magnusson, L. U., A. Farewell, and T. Nystrom.** 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**:236-42.
148. **Makino, K., M. Amemura, S. K. Kim, A. Nakata, and H. Shinagawa.** 1993. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **7**:149-60.
149. **Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, S. Kimura, A. Nakata, and A. Ishihama.** 1988. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J Mol Biol* **203**:85-95.
150. **Manterola, L., I. Moriyon, E. Moreno, A. Sola-Landa, D. S. Weiss, M. H. Koch, J. Howe, K. Brandenburg, and I. Lopez-Goni.** 2005. The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* **187**:5631-9.
151. **Mao, Y., M. P. Doyle, and J. Chen.** 2001. Insertion mutagenesis of *wca* reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **183**:3811-5.
152. **Mao, Y., M. P. Doyle, and J. Chen.** 2006. Role of colanic acid exopolysaccharide in the survival of enterohaemorrhagic *Escherichia*

- coli* O157:H7 in simulated gastrointestinal fluids. *Lett Appl Microbiol* **42**:642-7.
153. **Masuda, N., and G. M. Church.** 2003. Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **48**:699-712.
  154. **Matsushita, M., and K. D. Janda.** 2002. Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem* **10**:855-67.
  155. **Matsuzaki, K., K. Sugishita, and K. Miyajima.** 1999. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett* **449**:221-4.
  156. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**:536-40.
  157. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**:494-503.
  158. **Mendrygal, K. E., and J. E. Gonzalez.** 2000. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**:599-606.
  159. **Miller, S. I., R. K. Ernst, and M. W. Bader.** 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* **3**:36-46.
  160. **Molina, P. M., A. E. Parma, and M. E. Sanz.** 2003. Survival in acidic and alcoholic medium of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolated in Argentina. *BMC Microbiol* **3**:17.
  161. **Monds, R. D., P. D. Newell, R. H. Gross, and G. A. O'Toole.** 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63**:656-79.
  162. **Monds, R. D., P. D. Newell, J. A. Schwartzman, and G. A. O'Toole.** 2006. Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Appl Environ Microbiol* **72**:1910-24.
  163. **Monds, R. D., M. W. Silby, and H. K. Mahanty.** 2001. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* **42**:415-26.
  164. **Morohoshi, T., T. Maruo, Y. Shirai, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, and A. Kuroda.** 2002. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* **68**:4107-10.
  165. **Nakata, A., M. Amemura, and H. Shinagawa.** 1984. Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. *J Bacteriol* **159**:979-85.
  166. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic



- Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**:5048-56.
167. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**:593-656.
  168. **Nikaido, H., and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**:1-32.
  169. **Nishino, K., T. Honda, and A. Yamaguchi.** 2005. Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol* **187**:1763-72.
  170. **Nishino, K., F. F. Hsu, J. Turk, M. J. Cromie, M. M. Wosten, and E. A. Groisman.** 2006. Identification of the lipopolysaccharide modifications controlled by the *Salmonella* PmrA/PmrB system mediating resistance to Fe(III) and Al(III). *Mol Microbiol* **61**:645-54.
  171. **Nolan, L. K., S. M. Horne, C. W. Giddings, S. L. Foley, T. J. Johnson, A. M. Lynne, and J. Skyberg.** 2003. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet Res Commun* **27**:101-10.
  172. **Nolan, L. K., R. E. Wooley, C. W. Giddings, and J. Brown.** 1994. Characterization of an avirulent mutant of a virulent avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis* **38**:146-50.
  173. **Nummila, K., I. Kilpelainen, U. Zahringer, M. Vaara, and I. M. Helander.** 1995. Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol Microbiol* **16**:271-8.
  174. **Oganesyan, V., N. Oganesyan, P. D. Adams, J. Jancarik, H. A. Yokota, R. Kim, and S. H. Kim.** 2005. Crystal structure of the "PhoU-like" phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. *J Bacteriol* **187**:4238-44.
  175. **Olson, E. R.** 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol Microbiol* **8**:5-14.
  176. **Orskov, F., and I. Orskov.** 1990. The serology of capsular antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**:43-63.
  177. **Orskov, F., Orskov, I.** 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. *Methods microbiol* **14**:43-112.
  178. **Papo, N., and Y. Shai.** 2005. A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of Gram-negative bacteria from antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **280**:10378-87.
  179. **Parsek, M. R., and E. P. Greenberg.** 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**:27-33.
  180. **Paul, B. J., M. B. Berkmen, and R. L. Gourse.** 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:7823-8.
  181. **Perez, J. C., and E. A. Groisman.** 2007. Acid pH activation of the PmrA/PmrB two-component regulatory system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **63**:283-93.

182. **Pizarro-Cerda, J., and K. Tedin.** 2004. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **52**:1827-44.
183. **Pragai, Z., N. E. Allenby, N. O'Connor, S. Dubrac, G. Rapoport, T. Msadek, and C. R. Harwood.** 2004. Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**:1182-90.
184. **Pramoonjago, P., M. Kaneko, T. Kinoshita, E. Ohtsubo, J. Takeda, K. S. Hong, R. Inagi, and K. Inoue.** 1992. Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *J Immunol* **148**:827-36.
185. **Price, S. B., C. M. Cheng, C. W. Kaspar, J. C. Wright, F. J. DeGraves, T. A. Penfound, M. P. Castanie-Cornet, and J. W. Foster.** 2000. Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **66**:632-7.
186. **Primm, T. P., S. J. Andersen, V. Mizrahi, D. Avarbock, H. Rubin, and C. E. Barry, 3rd.** 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* **182**:4889-98.
187. **Puri-Taneja, A., S. Paul, Y. Chen, and F. M. Hulett.** 2006. CcpA causes repression of the *phoPR* promoter through a novel transcription start site, P(A6). *J Bacteriol* **188**:1266-78.
188. **Quivey, R. G., Jr., R. Faustoferri, K. Monahan, and R. Marquis.** 2000. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **189**:89-92.
189. **Raetz, C. R., C. B. Hirschberg, W. Dowhan, W. T. Wickner, and E. P. Kennedy.** 1972. A membrane-bound pyrophosphatase in *Escherichia coli* catalyzing the hydrolysis of cytidine diphosphate-diglyceride. *J Biol Chem* **247**:2245-7.
190. **Raetz, C. R., C. M. Reynolds, M. S. Trent, and R. E. Bishop.** 2007. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Biochem* **76**:295-329.
191. **Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial Lipopolysaccharides: a Remarkable Family of Bioactive Macroamphiphiles. *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. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
192. **Raja, N., M. Goodson, W. C. Chui, D. G. Smith, and R. J. Rowbury.** 1991. Habituation to acid in *Escherichia coli*: conditions for habituation and its effects on plasmid transfer. *J Appl Bacteriol* **70**:59-65.
193. **Raja, N., M. Goodson, D. G. Smith, and R. J. Rowbury.** 1991. Decreased DNA damage by acid and increased repair of acid-damaged DNA in acid-habituated *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* **70**:507-11.
194. **Rallu, F., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2000. Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* : identification of intracellular stress signals. *Mol Microbiol* **35**:517-28.

195. **Ramanathan, B., E. G. Davis, C. R. Ross, and F. Blecha.** 2002. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect* **4**:361-72.
196. **Rao, N. N., and A. Kornberg.** 1999. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol* **23**:183-95.
197. **Rao, N. N., E. Wang, J. Yashphe, and A. Torriani.** 1986. Nucleotide pool in pho regulon mutants and alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **166**:205-11.
198. **Rao, P. S., Y. Yamada, Y. P. Tan, and K. Y. Leung.** 2004. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* **53**:573-86.
199. **Raser, J. M., and E. K. O'Shea.** 2005. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* **309**:2010-3.
200. **Rashid, M. H., and A. Kornberg.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4885-90.
201. **Rashid, M. H., K. Rumbaugh, L. Passador, D. G. Davies, A. N. Hamood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg.** 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:9636-41.
202. **Ren, D., L. A. Bedzyk, R. W. Ye, S. M. Thomas, and T. K. Wood.** 2004. Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**:2038-43.
203. **Richard, H., and J. W. Foster.** 2004. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J Bacteriol* **186**:6032-41.
204. **Richard, H. T., and J. W. Foster.** 2003. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* **52**:167-86.
205. **Rowbury, R. J.** 1995. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and other enterobacteria. *Lett Appl Microbiol* **20**:333-7.
206. **Rowbury, R. J.** 2001. Cross-talk involving extracellular sensors and extracellular alarmones gives early warning to unstressed *Escherichia coli* of impending lethal chemical stress and leads to induction of tolerance responses. *J Appl Microbiol* **90**:677-95.
207. **Rowbury, R. J.** 2001. Extracellular sensing components and extracellular induction component alarmones give early warning against stress in *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **44**:215-57.
208. **Rowbury, R. J.** 1999. Extracellular sensors and inducible protective mechanisms. *Trends Microbiol* **7**:345-6.
209. **Rowbury, R. J., and M. Goodson.** 2001. Extracellular sensing and signalling pheromones switch-on thermotolerance and other stress responses in *Escherichia coli*. *Sci Prog* **84**:205-33.

210. **Rowbury, R. J., and M. Goodson.** 1993. PhoE porin of *Escherichia coli* and phosphate reversal of acid damage and killing and of acid induction of the CadA gene product. *J Appl Bacteriol* **74**:652-61.
211. **Rowbury, R. J., M. Goodson, and A. D. Wallace.** 1992. The PhoE porin and transmission of the chemical stimulus for induction of acid resistance (acid habituation) in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* **72**:233-43.
212. **Ruberg, S., A. Puhler, and A. Becker.** 1999. Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology* **145 ( Pt 3)**:603-11.
213. **Ruiz, N., and T. J. Silhavy.** 2003. Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates *rpoS* translation in an Hfq-dependent fashion. *J Bacteriol* **185**:5984-92.
214. **Runyen-Janecky, L. J., A. M. Boyle, A. Kizzee, L. Liefer, and S. M. Payne.** 2005. Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **73**:1404-10.
215. **Russo, T. A.** 2002. Capsule and Lipopolysaccharide, p. 379-403. *In* M. S. Donnenberg (ed.), *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Academic Press, San Diego.
216. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**:1753-4.
217. **Samartzidou, H., and A. H. Delcour.** 1999. Distinct sensitivities of OmpF and PhoE porins to charged modulators. *FEBS Lett* **444**:65-70.
218. **Samartzidou, H., M. Mehrazin, Z. Xu, M. J. Benedik, and A. H. Delcour.** 2003. Cadaverine inhibition of porin plays a role in cell survival at acidic pH. *J Bacteriol* **185**:13-9.
219. **Schurdell, M. S., G. M. Woodbury, and W. R. McCleary.** 2007. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J Bacteriol* **189**:1150-3.
220. **Schweizer, H., M. Argast, and W. Boos.** 1982. Characteristics of a binding protein-dependent transport system for *sn*-glycerol-3-phosphate in *Escherichia coli* that is part of the *pho* regulon. *J Bacteriol* **150**:1154-63.
221. **Seputiene, V., D. Motiejunas, K. Suziedelis, H. Tomenius, S. Normark, O. Melefors, and E. Suziedeliene.** 2003. Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *J Bacteriol* **185**:2475-84.
222. **Seputiene, V., K. Suziedelis, S. Normark, O. Melefors, and E. Suziedeliene.** 2004. Transcriptional analysis of the acid-inducible *asr* gene in enterobacteria. *Res Microbiol* **155**:535-42.
223. **Shi, L., and F. M. Hulett.** 1999. The cytoplasmic kinase domain of PhoR is sufficient for the low phosphate-inducible expression of *pho* regulon genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **31**:211-22.

224. **Slonczewski, J. L., Foster, J.W.** 1996. pH-Regulated Genes and Survival at Extreme pH, p. 1539-1549. *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. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
225. **Small, P., D. Blankenhorn, D. Welty, E. Zinser, and J. L. Slonczewski.** 1994. Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J Bacteriol* **176**:1729-37.
226. **Smith, M. W., and J. W. Payne.** 1992. Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **79**:183-90.
227. **Smits, W. K., O. P. Kuipers, and J. W. Veening.** 2006. Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Microbiol* **4**:259-71.
228. **Sojka, W. J.** 1971. Enteric diseases in new-born piglets, calves and lambs due to *Escherichia coli* infection. *Vet Bull* **41**.
229. **Sola, M., D. L. Drew, A. G. Blanco, F. X. Gomis-Ruth, and M. Coll.** 2006. The cofactor-induced pre-active conformation in PhoB. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**:1046-57.
230. **Sola, M., F. X. Gomis-Ruth, L. Serrano, A. Gonzalez, and M. Coll.** 1999. Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J Mol Biol* **285**:675-87.
231. **Spira, B., N. Silberstein, and E. Yagil.** 1995. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for P<sub>i</sub>. *J Bacteriol* **177**:4053-8.
232. **Spira, B., and E. Yagil.** 1999. The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **38**:80-5.
233. **Spira, B., and E. Yagil.** 1998. The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**:469-77.
234. **Srinivasa Rao, P. S., T. M. Lim, and K. Y. Leung.** 2003. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Infect Immun* **71**:1343-51.
235. **Steed, P. M., and B. L. Wanner.** 1993. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* **175**:6797-809.
236. **Stephenson, K., and J. A. Hoch.** 2004. Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms. *Curr Med Chem* **11**:765-73.
237. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**:183-215.
238. **Stordeur, P., A. Bree, J. Mainil, and M. Moulin-Schouleur.** 2004. Pathogenicity of *pap*-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicemic lesions. *Microbes Infect* **6**:637-45.

239. **Sturr, M. G., and R. E. Marquis.** 1992. Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **58**:2287-91.
240. **Summers, M. L., M. C. Denton, and T. R. McDermott.** 1999. Genes coding for phosphotransacetylase and acetate kinase in *Sinorhizobium meliloti* are in an operon that is inducible by phosphate stress and controlled by *phoB*. *J Bacteriol* **181**:2217-24.
241. **Surin, B. P., H. Rosenberg, and G. B. Cox.** 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J Bacteriol* **161**:189-98.
242. **Suziedeliene, E., K. Suziedelis, V. Garbenciute, and S. Normark.** 1999. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J Bacteriol* **181**:2084-93.
243. **Tamayo, R., B. Choudhury, A. Septer, M. Merighi, R. Carlson, and J. S. Gunn.** 2005. Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J Bacteriol* **187**:3391-9.
244. **Tamayo, R., A. M. Prouty, and J. S. Gunn.** 2005. Identification and functional analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PmrA-regulated genes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **43**:249-58.
245. **Taschner, N. P., E. Yagil, and B. Spira.** 2004. A differential effect of sigmaS on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**:2985-92.
246. **Taschner, N. P., E. Yagil, and B. Spira.** 2006. The effect of IHF on sigmaS selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **185**:234-7.
247. **Taylor, C. M., M. Beresford, H. A. Epton, D. C. Sigeo, G. Shama, P. W. Andrew, and I. S. Roberts.** 2002. *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J Bacteriol* **184**:621-8.
248. **Taylor, P. W.** 1983. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **47**:46-83.
249. **Todt, J. C., W. J. Rocque, and E. J. McGroarty.** 1992. Effects of pH on bacterial porin function. *Biochemistry* **31**:10471-8.
250. **Tran, A. X., M. J. Karbarz, X. Wang, C. R. Raetz, S. C. McGrath, R. J. Cotter, and M. S. Trent.** 2004. Periplasmic cleavage and modification of the 1-phosphate group of *Helicobacter pylori* lipid A. *J Biol Chem* **279**:55780-91.
251. **Trent, M. S.** 2004. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem Cell Biol* **82**:71-86.
252. **Trent, M. S., A. A. Ribeiro, S. Lin, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2001. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J Biol Chem* **276**:43122-31.

253. **Tucker, D. L., N. Tucker, and T. Conway.** 2002. Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:6551-8.
254. **Tucker, D. L., N. Tucker, Z. Ma, J. W. Foster, R. L. Miranda, P. S. Cohen, and T. Conway.** 2003. Genes of the GadX-GadW regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:3190-201.
255. **Vaara, M.** 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**:395-411.
256. **Vaara, M.** 1999. Lipopolysaccharide and the permeability of the bacterial outer membrane, p. 31-38. *In* I. B. Helmut (ed.), *Endotoxin in health and disease*. Marcel Dekker, Inc.
257. **Vaara, M.** 1992. The outer membrane as the penetration barrier against mupirocin in gram-negative enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother* **29**:221-2.
258. **van den Berg, B.** 2005. The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. *Curr Opin Struct Biol* **15**:401-7.
259. **van den Berg, B., P. N. Black, W. M. Clemons, Jr., and T. A. Rapoport.** 2004. Crystal structure of the long-chain fatty acid transporter FadL. *Science* **304**:1506-9.
260. **Van Dien, S. J., and J. D. Keasling.** 1998. A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. *J Theor Biol* **190**:37-49.
261. **Van Dien, S. J., and J. D. Keasling.** 1999. Effect of polyphosphate metabolism on the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. *Biotechnol Prog* **15**:587-93.
262. **VanBogelen, R. A., E. R. Olson, B. L. Wanner, and F. C. Neidhardt.** 1996. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:4344-66.
263. **Verhamme, D. T., J. C. Arents, P. W. Postma, W. Crielaard, and K. J. Hellingwerf.** 2002. Investigation of *in vivo* cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:69-78.
264. **Vimr, E. R.** 1991. Map position and genomic organization of the kps cluster for polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* **173**:1335-8.
265. **von Kruger, W. M., S. Humphreys, and J. M. Ketley.** 1999. A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* **145**:2463-75.
266. **von Kruger, W. M., L. M. Lery, M. R. Soares, F. S. de Neves-Manta, C. M. Batista e Silva, A. G. Neves-Ferreira, J. Perales, and P. M. Bisch.** 2006. The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* **6**:1495-511.
267. **Walsh, A. G., M. J. Matewish, L. L. Burrows, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and J. S. Lam.** 2000. Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **35**:718-27.

268. **Wang, A. Y., and J. E. Cronan, Jr.** 1994. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol Microbiol* **11**:1009-17.
269. **Wanner, B. L.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**:47-54.
270. **Wanner, B. L.** 1992. Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* **174**:2053-8.
271. **Wanner, B. L.** 1997. Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*, p. 104-128. *In* S. W. Silver, William (ed.), *Metal ions in gene regulation*. Springer.
272. **Wanner, B. L.** 1996. 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, D.C.
273. **Wanner, B. L.** 1995. Signal Transduction and Cross Regulation in the *Escherichia coli* Phosphate Regulon by PhoR, CreC, and Acetyl Phosphate, p. 203-221. *In* J. A. Hoch, Silhavy, T.A. (ed.), *Two-component Signal Transduction*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
274. **Wanner, B. L., Weihong, J. Kim, S.K., Yamagata, S., Haldimann, A., Daniels, L.L.** 1996. Are the multiple signal transduction pathways of the Pho regulon due to cross talk or cross regulation? p. 297-315. *In* E. C. C. Lin, Lynch, S. (ed.), *Regulation of gene expression in Escherichia coli*. R.G. Landes company, Austin, TX.
275. **Wanner, B. L., and M. R. Wilmes-Riesenberg.** 1992. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:2124-30.
276. **Wanner, B. L., M. R. Wilmes, and D. C. Young.** 1988. Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant by adenyl cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon. *J Bacteriol* **170**:1092-102.
277. **Waters, C. M., and B. L. Bassler.** 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:319-46.
278. **Waters, V. L., and J. H. Crosa.** 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55**:437-50.
279. **Webb, D. C., H. Rosenberg, and G. B. Cox.** 1992. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* **267**:24661-8.
280. **Wehrend, A., K. Failing, J. Tschachtschal, and H. Bostedt.** 2003. Reference values of electrolyte plasma concentrations in healthy piglets



- during the first 48 hours of life. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **50**:67-71.
281. **Wessjohann, L. A., W. Brandt, and T. Thiemann.** 2003. Biosynthesis and metabolism of cyclopropane rings in natural compounds. *Chem Rev* **103**:1625-48.
282. **West, A. H., and A. M. Stock.** 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**:369-76.
283. **White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, and T. S. Whittam.** 1993. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb Pathog* **14**:399-409.
284. **White, D. G., R. A. Wilson, D. A. Emery, K. V. Nagaraja, and T. S. Whittam.** 1993. Clonal diversity among strains of *Escherichia coli* incriminated in turkey colisepticemia. *Vet Microbiol* **34**:19-34.
285. **Whitfield, C., and I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**:1307-19.
286. **Wiese, A., P. Grunewald, K. J. Schaper, and U. Seydel.** 2001. Influence of acyl chain fluidity on the lipopolysaccharide-induced activation of complement. *J Endotoxin Res* **7**:147-55.
287. **Willsky, G. R., R. L. Bennett, and M. H. Malamy.** 1973. Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *J Bacteriol* **113**:529-39.
288. **Willsky, G. R., and M. H. Malamy.** 1976. Control of the synthesis of alkaline phosphatase and the phosphate-binding protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **127**:595-609.
289. **Wilmes-Riesenberg, M. R., and B. L. Wanner.** 1992. *TnphoA* and *TnphoA'* elements for making and switching fusions for study of transcription, translation, and cell surface localization. *J Bacteriol* **174**:4558-75.
290. **Winfield, M. D., and E. A. Groisman.** 2004. Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17162-7.
291. **Winfield, M. D., T. Latifi, and E. A. Groisman.** 2005. Transcriptional regulation of the 4-amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in *Yersinia pestis*. *J Biol Chem* **280**:14765-72.
292. **Wolanin, P. M., P. A. Thomason, and J. B. Stock.** 2002. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**:REVIEWS3013.
293. **Wolfe, A. J.** 2005. The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**:12-50.
294. **Xu, G. Z., B. Shi, E. J. McGroarty, and H. T. Tien.** 1986. Channel-closing activity of porins from *Escherichia coli* in bilayer lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **862**:57-64.

295. **Yethon, J. A., J. S. Gunn, R. K. Ernst, S. I. Miller, L. Laroche, D. Malo, and C. Whitfield.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium *waaP* mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence *In vivo*. *Infect Immun* **68**:4485-91.
296. **Yethon, J. A., D. E. Heinrichs, M. A. Monteiro, M. B. Perry, and C. Whitfield.** 1998. Involvement of *waaY*, *waaQ*, and *waaP* in the modification of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and their role in the formation of a stable outer membrane. *J Biol Chem* **273**:26310-6.
297. **Yethon, J. A., and C. Whitfield.** 2001. Purification and characterization of WaaP from *Escherichia coli*, a lipopolysaccharide kinase essential for outer membrane stability. *J Biol Chem* **276**:5498-504.
298. **Yin, N., R. L. Marshall, S. Matheson, and P. B. Savage.** 2003. Synthesis of lipid A derivatives and their interactions with polymyxin B and polymyxin B nonapeptide. *J Am Chem Soc* **125**:2426-35.
299. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, and T. M. Finan.** 2006. Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**:1089-102.
300. **Yuan, Z. C., R. Zaheer, R. Morton, and T. M. Finan.** 2006. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **34**:2686-97.
301. **Zhang, G., C. R. Ross, and F. Blecha.** 2000. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res* **31**:277-96.
302. **Zhang, Y. M., H. Marrakchi, and C. O. Rock.** 2002. The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**:15558-65.
303. **Zhou, L., G. Grégori, J. M. Blackman, J. P. Robinson, and B. L. Wanner.** 2005. Stochastic activation of the response regulator PhoB by noncognate histidine kinases. *Journal of Integrative Bioinformatics* **2**:11.
304. **Zhou, Z., S. Lin, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 1999. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, phosphoethanolamine and palmitate. *J Biol Chem* **274**:18503-14.
305. **Zhou, Z., A. A. Ribeiro, and C. R. Raetz.** 2000. High-resolution NMR spectroscopy of lipid A molecules containing 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine substituents. Different attachment sites on lipid A molecules from  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ -treated *Escherichia coli* versus *kdsA* mutants of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **275**:13542-51.
306. **Zhu, C., M. Ngeleka, A. A. Potter, and B. J. Allan.** 2002. Effect of *fur* mutation on acid-tolerance response and *in vivo* virulence of avian septicemic *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **48**:458-62.

# ANNEXES

## ARTICLE 4

# **The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis**

Martin G. Lamarche, Barry L. Wanner, Sébastien Crépin. and Josée Harel

Manuscrit soumis dans FEMS Microbiology Reviews

MS No. FEMSRE-07-07-0035

## **The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis**

Martin G. Lamarche<sup>1</sup>, Barry L. Wanner<sup>2</sup>, Sébastien Crépin<sup>1</sup> and Josée Harel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Groupe 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. ; <sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907 USA

\*Author for correspondence:      Josée Harel    Telephone: (450) 773  
8521 ext 8233

Fax: (450) 778 8108

e-mail:



Running title: Pho regulon and bacterial virulence

Key words: Pho regulon, Pst system, bacterial virulence, cross-regulation, stress responses and stochastic activation.

## **Abstract**

Bacterial pathogens co-ordinately regulate virulence factor gene expression in response to environmental stimuli, including nutrient starvation. The phosphate (Pho) regulon plays a key role in phosphate homeostasis. It is controlled by the PhoR/PhoB two-component regulatory system. PhoR is an integral membrane signalling histidine kinase that through an interaction with the ABC-type phosphate specific transport (Pst) system and a protein called PhoU somehow senses environmental inorganic phosphate ( $P_i$ ) levels. Under conditions of  $P_i$  limitation (or absence of a Pst component or PhoU), PhoR activates its partner response regulator PhoB by phosphorylation, which in turn up- or down-regulates target genes. Single-cell profiling of PhoB activation has recently shown that Pho regulon gene expression exhibits a stochastic, “all-or-none,” behaviour. Recent studies have also shown that the Pho regulon plays a role in virulence of several bacteria. Here, we present a comprehensive overview on the role of the Pho regulon in bacterial virulence. 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 stress response.

## Introduction

Phosphate is an essential nutrient for cell functions and life. It is found in lipids, nucleic acids, proteins, sugars and is involved in many biochemical reactions that rely on transfer of phosphoryl groups. The Pho regulon is a global regulatory circuit involved in bacterial phosphate management (Wanner, 1993, Wanner, 1996). It has been best studied in model cells like *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In *E. coli*, the Pho regulon is comprised of at least 47 genes (Wanner, 1996, Han, *et al.*, 1999, Suziedeliene, *et al.*, 1999, Harris, *et al.*, 2001, Baek & Lee, 2006). Recently, additional genes with putative Pho operator containing Pho boxes have been identified (Yuan, *et al.*, 2006). 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 (VanBogelen, *et al.*, 1996). Such a high number, which represents almost 10% of the *E. coli* genome, reflects the importance of phosphate in cellular processes. It seems likely that such a network influence the virulence of bacterial pathogens. Indeed, as we discuss in this review, it is now clear that the Pho regulon influences bacterial virulence and, in some bacteria, directly controls virulence gene expression. We will first present a brief overview of the role of the Pho regulon. We will then describe strategies involving the Pho regulon that bacteria have evolved to survive adverse conditions. Finally, we will focus on the evidence that links the Pho regulon to bacterial virulence. The role played by the Pho regulon in stress responses explains how the Pho regulon can be involved both in phosphate homeostasis and pathogenesis. To illustrate this, we will present bacterial

mechanisms involved in tolerance to acidity and biofilm formation, both of which are responses to harsh environmental conditions but have also been related to the Pho regulon and virulence. Also, we will discuss how the stochastic properties of Pho regulon gene expression can have a major impact on bacterial pathogenesis.

## **I. Control of the Pho regulon**

### **1. The PhoR/PhoB TCRS two-component regulatory system**

In bacteria, many external conditions are sensed by two-component regulatory systems (TCRS) responsible for signal transduction and gene regulation. The TCRS are important for the adaptation, survival and the pathogenic responses of bacteria (Hoch, 2000, West & Stock, 2001, Beier & Gross, 2006). The Pho regulon is controlled by the PhoR/PhoB TCRS. PhoR is an inner membrane histidine kinase (HK) sensor protein that appears to respond to periplasmic orthophosphate ( $P_i$ ) concentration variations through interaction with a phosphate transport system. In some microorganisms, e. g., *Saccharomyces cerevisiae*, intracellular phosphate has also a role in the control of the Pho regulon (Auesukaree, *et al.*, 2004). Even though intracellular phosphate is likely to influence Pho regulon activity, such phenomenon has not yet been demonstrated in bacteria. PhoB is a response regulator (RR) that acts as a DNA-binding protein to activate or inhibit gene transcription (Smith & Payne, 1992, Wanner, 1996, Harris, *et al.*, 2001, Blanco, *et al.*, 2002). The activation signal, a phosphate concentration below 4  $\mu$ M, is transmitted by a phospho-relay between the two partner proteins, from PhoR to PhoB (Figure 1). PhoR is auto-



phosphorylated on a histidine residue and transfers this phosphoryl group to an aspartate residue of the PhoB regulator through transitory interaction. Phospho-PhoB in turn controls Pho regulon gene expression.

## **2. The phosphate specific transport system and inhibition of the Pho regulon**

The phosphate specific transport (Pst) system belongs to the Pho regulon. Moreover, the Pst system is linked to the molecular mechanisms that lead to turning off the Pho regulon. Four proteins (PstS, PstC, PstA, and PstB) form an ABC transporter important for the high affinity capture of periplasmic inorganic phosphate ( $P_i$ ) and its low velocity transport into the cytosol (Van Dien & Keasling, 1998). These proteins are encoded together with a protein called PhoU in the polycistronic *pstSCAB-phoU* operon. PstS is a periplasmic protein that binds  $P_i$  with high affinity. PstC and PstA are inner membrane channel proteins for  $P_i$  entry, while PstB is an ATP dependent permease component that liberates the necessary energy for  $P_i$  transport from the periplasm to the cytosol. When phosphate is in excess, the Pst system is thought to form a repression (inhibition) complex with PhoR that prevents activation of PhoB. Phosphate limitation leads to conversion of PhoR into an activated form in which PhoR is autophosphorylated and transfers a phosphoryl group to PhoB. A return to the repression (inhibition) state occurs during growth shift to phosphate rich environment; the activation signal is interrupted by PhoR acting as a phosphatase on phospho-PhoB. PhoU and PstB are also required for dephosphorylation of phospho-PhoB (Figure 1) (Wanner, 1997). Indeed, PhoU is essential for the

repression of the Pho regulon in high phosphate condition (Wanner, 1996). While the precise mechanism how PhoU acts is not yet understood, it is reasonable to suggest that PhoU acts by binding to PhoR, PhoB, or a PhoR/PhoB complex as a chaperone to promote dephosphorylation of phospho-PhoB or by inhibiting formation of the PhoR-PhoB transitory complex (Oganessian, *et al.*, 2005). In many bacterial species, mutations in the Pst system result in constitutive expression of the Pho regulon, regardless of environmental phosphate availability (Wanner, 1996).

### 3. Cross-regulation

Many environmental conditions can modulate the activity of a RR by a non-partner HK via a mechanism known as cross-regulation. Indeed, PhoB activity can be induced in the absence of signal transduction from its cognate partner protein PhoR. Also, CreC, a sensor protein of the CreC/CreB TCRS implicated in the regulation of genes involved in carbon catabolism, can induce PhoB activity in the absence of PhoR (Wanner & Wilmes-Riesenberg, 1992). Also, the phosphotransacetylase-acetate kinase (Pta-AckA) pathway, belonging to the Cre regulon (Avison, *et al.*, 2001), generates an intermediary product named acetyl phosphate that can also cause activation of PhoB (Kim, *et al.*, 1996, Wanner, 1996). Curiously, genes of the Pta-AckA pathway belong to the Pho regulon in the symbiotic bacteria *Sinorhizobium meliloti* (Summers, *et al.*, 1999). These are only two examples from a variety of situations known to result in modification of the phosphorylation status of PhoB in the absence of PhoR (Wanner, *et al.*, 1988, Wanner, 1992, Wanner & Wilmes-Riesenberg, 1992, Wilmes-

Riesenberg & Wanner, 1992, Fisher, *et al.*, 1995, Wanner, 1995, Haldimann, *et al.*, 1996, Kim, *et al.*, 1996, Wanner, 1996, Zhou *et al.*, 2005, Verhamme, *et al.*, 2002, Nishino, *et al.*, 2005). Nevertheless, because of cross-regulation, particular TCRS responding to a variety of environmental signals may influence expression of genes belonging to the Pho regulon. For example cross-regulation (phosphorylation) of PhoB by a non-partner HK may result in normal cells when the amount of PhoR protein is limiting (Wanner & Wilmes-Riesenberg, 1992). In this regard, cell-to-cell variation in the amount of an HK like PhoR can lead to cells with no PhoR protein stochastically because the amount of PhoR normally constitutes only ten or so molecules per cell (Wanner, 1996). Such mechanisms are likely to contribute to adaptation to changing environments. In *Bacillus subtilis*, however, whose Pho regulon genes are controlled by three known TCRS (Sun, *et al.*, 1996), the induction of Pho is abolished in absence of the HK PhoR. This is an illustration of a multiple signals input system required for the control of a precise set of genes.

#### **4. Stochastic activation of the RR PhoB**

Single-cell profiling of PhoB activation has recently revealed an unforeseen stochastic, “all-or-none,” character of Pho regulon gene expression (Zhou, *et al.*, 2005). Such variation in gene expression, also referred as noise, occurs within a population of genetically identical bacterial cells (Raser & O'Shea, 2005). Recent studies showed that at least six noncognate HKs (QseC, ArcB, CreC, KdpD, BaeS and EnvZ) can activate the RR PhoB, in absence of PhoR and acetyl phosphate biosynthesis. In all cases, PhoB

activation results in a bimodal distribution of cells expressing the Pho regulon (Zhou, *et al.*, 2005). In other words, in the presence of a PhoB activation signal, a proportion of the cell population remains un-induced, showing a threshold instead of a graded activation response. What factor or combination of factors determines the activation threshold is unknown. However, it is likely that components of the phosphorylation cascade, such as the amount of HK, phospho-HK, RR and phospho-RR as well as other factors, contribute to the threshold phenomenon (Zhou, *et al.*, 2005). Moreover, the autoregulation of PhoR/PhoB synthesis, forming a positive feedback loop, is likely to contribute to the stochastic behaviour in gene expression and to the emergence of multiple stable phenotypes within a population of genetically identical cells (Smits, *et al.*, 2006). It also contributes to the propagation and auto-amplification of the noise to downstream genes (Pedraza & van Oudenaarden, 2005). This kind of 'noise' was shown to have great consequences on the phenotypic diversity within a population of cells (Elowitz, *et al.*, 2002, Ozbudak, *et al.*, 2002). Such diversity contributes to the fitness of cell subpopulations in changing environments and is likely to have great impact on adaptation of bacterial pathogens within a host (Balaban, *et al.*, 2004, Kaern, *et al.*, 2005). Importantly, stochastic activation of gene expression was also found to occur upon activation of PhoB by PhoR in response to  $P_i$  limitation (Zhou L and Wanner BL, unpublished data), suggesting that stochastic activation of Pho regulon gene expression occurs in normal cells. Consequently, stochastic effects of this kind must be taken into account as part of the

equation connecting bacterial pathogenesis and the Pho regulon, as discussed below.

## **II. Phosphate and the adaptation/survival response**

### **1. Adaptation of bacterial cell surface components to phosphate deprivation**

To deal with phosphate starvation conditions, bacteria rely on different mechanisms to optimize the acquisition and the bioavailability of phosphate and to maintain essential biochemical reactions. For instance, some bacteria change their shape to enhance the surface to volume ratio, getting more in contact with the surrounding environment and enhancing chances to capture essential nutrients including phosphate. This is exemplified by the stalk elongation of *Caulobacter crescentus* which is regulated by a phosphate-limiting environment in a Pho regulon-dependent manner (Gonin, *et al.*, 2000, Wagner, *et al.*, 2006). In phosphate starvation conditions, many bacteria modify their cell surface components. In *B. subtilis*, the replacement of the cell wall phosphate-rich teichoic acid with the phosphate-free teichuronic acid occurs in phosphate-limiting environments. In these bacteria, the teichoic acid synthesis genes *tagA* and *tagD* and the teichuronic acid synthesis operon *tua* are under the control of the *B. subtilis* PhoR/PhoP TCRS (Pragai, *et al.*, 2004). In *S. meliloti* mutants of phosphate uptake system PhoCDET, which is homologous to PstSCAB, phosphate-free lipids substitute for phospholipids (Geiger, *et al.*, 1999). These mutants also failed to fix nitrogen and form smaller white nodules on alfalfa. These phenotypes are due to effects of PhoB on gene expression because a

mutation in *phoB* restores the wild-type phenotype and that the Pho regulon is constitutively activated in *phoCDET* mutants. These observations strongly suggest an involvement of the Pho regulon in the control of genes that are part of the adaptation and survival response (Bardin, *et al.*, 1996, Yuan, *et al.*, 2006). Moreover, in *S. meliloti*, PhoB positively regulates the synthesis of some exopolysaccharides, which are involved in the bacterial invasion of root nodules, when phosphate is scarce in the environment (Ruberg, *et al.*, 1999, Mendrygal & Gonzalez, 2000).

## **2. Environmental stresses, stringent response and the Pho regulon**

In bacteria, cellular metabolism changes occur during environmental stress conditions that permit cells to survive in adverse conditions (Weber, *et al.*, 2005, Jain, *et al.*, 2006, Klauck, *et al.*, 2007). Many lines of evidence suggest that the Pho regulon and the stress response are interrelated (Spira, *et al.*, 1995, Spira & Yagil, 1998, Ruiz & Silhavy, 2003, Taschner, *et al.*, 2004, Taschner, *et al.*, 2006, Schurdell, *et al.*, 2007). The figure 2 illustrates interconnections between the Pho regulon and some key factors involved in nutritional and other stress responses. The role of these factors is briefly discussed in this section. Polyphosphate (poly P) is a known stress response molecule synthesized when environmental stresses occur, e. g., nutrient starvation and high salt concentrations among others {Kornberg, 1999 #59}. Cells having an imbalance in their poly P reserves have been shown to elicit a defective response to adverse environmental conditions (Brown & Kornberg, 2004). Poly P can serve both as a phosphate reservoir and energy source in different biological processes. For instance, poly P can substitute

for ATP in phosphorylation reactions by kinases. Poly P also acts as a metal-chelating agent or as a buffer in alkali environment (Kornberg, *et al.*, 1999). In some bacterial species, such as *Klebsiella aerogenes* and *Streptomyces lividans*, the poly P kinase gene *ppk*, which is involved in the poly P synthesis, has been reported to be under the control of the PhoR/PhoB TCRS (Kato, *et al.*, 1993, Ghorbel, *et al.*, 2006). Similarly, PhoB has been shown to be required for poly P accumulation in *E. coli* (Figure 2) (Rao & Kornberg, 1999).

Guanosine tetraphosphate (ppGpp) is a key phosphate-containing molecule that initiates changes in global metabolism under nutritional stress, which is known as the stringent stress response (Chatterji & Ojha, 2001, Magnusson, *et al.*, 2005, Paul, *et al.*, 2005). The ppGpp nucleotide induces RpoS accumulation (Hengge-Aronis, 2002). RpoS is a sigma factor implicated in the cellular response to many stresses such as osmotic, oxidative and acid stresses. It is also implicated in the stationary phase and the induction of genes in nutrients-limiting environment (Loewen, *et al.*, 1998). Repression of the Pho regulon occurs in *E. coli* mutants that cannot accumulate ppGpp, such as *relA* and *spoT* mutants, whereas a mutation in *Pst* downregulates ppGpp synthesis (Figure 2)(Spira, *et al.*, 1995, Spira & Yagil, 1998). This suggests a regulatory link between ppGpp and the Pho regulon. The presence of an inverted Pho Box in the -10 region of the *spoT* promoter has led to the suggestion that SpoT activity could depend on the Pho regulation (Sarubbi, *et al.*, 1989, Spira & Yagil, 1998). Although direct evidence is lacking, other results link the Pho regulon to the stringent stress response.

For example, Pst mutants accumulate RpoS when grown to exponential phase. This phenomenon is dependent on Hfq, a post-transcriptional regulator that interacts with various RNAs, and requires intact PhoB (Figure 2) (Ruiz & Silhavy, 2003). Furthermore, Schurdell and co-workers have recently shown that the 3' end of the processed *pstCA* transcript is likely to mediate RpoS accumulation through a direct interaction with the 5'-untranslated leader region of *rpoS*, stimulating translation of *rpoS* (Figure 2) (Schurdell, *et al.*, 2007). Bougdour and Gottesman (2007) have recently shown that ppGpp accumulation during phosphate starvation promotes transcription of the *iraP* coding for a small protein that interferes with RssB-dependent degradation of RpoS (Bougdour, *et al.*, 2006, Bougdour & Gottesman, 2007). Thus the Pho regulon influences the production of poly P, ppGpp and RpoS, all of which are necessary for proper adaptation and survival response in bacteria. Accordingly, changes in the levels of a number of effector molecules may occur in *E. coli phoBR* and *pst* mutants, resulting in an aberrant stress response.

### **III. Pho regulation and virulence**

A correlation between inactivation of the Pst system, constitutive expression of the Pho regulon, and bacterial virulence has been established in a number of cases. Table 1 lists some important studies in which *pst*, *phoBR*, and Pho regulon genes have been shown to be important in bacterial virulence from different approaches.



## 1. Pst mutants and virulence

Several studies link the Pst system with virulence. A Pst mutant of the porcine extraintestinal pathogenic *E. coli* ExPEC strain was shown to be avirulent in a colostrum-deprived newborn pigs infection model. Insertional inactivation of *pst* has multiple effects on virulence traits such as an increased sensitivity to the bactericidal effect of serum and a significant reduction in the amount of capsular antigen at the cell surface (Harel, *et al.*, 1992, Ngeleka, *et al.*, 1992, Daigle, *et al.*, 1995). More recently, deletion of the *pst* genes in an ExPEC strain belonging to the avian pathogenic *E. coli* APEC group (Lamarche, *et al.*, 2005) was shown to reduce virulence in a chicken infection model. The *pst* mutation affects multiple virulence attributes; it reduces resistance to the bactericidal effect of serum, to acidity and to cationic antimicrobial peptides (Lamarche, *et al.*, 2005). These results are suggestive, in part, of bacterial cell surface modifications. In the uropathogenic *E. coli* UPEC strain, Bahrani-Mougeot *et al.* (2002) identified a *phoU* mutant by signature tag mutagenesis (STM), an approach that permits finding genes that are important for infection, using a murine model of ascending urinary tract infection (UTI) (Bahrani-Mougeot, *et al.*, 2002). The ability of the *phoU* mutant to colonize the murine urinary tract was impaired in a competition infection assay with the wild-type strain (Buckles, *et al.*, 2006). A *pst* mutant was also identified by STM in *Proteus mirabilis* using an UTI model (Burall, *et al.*, 2004). Lastly, transposon mutants of *pst* in *Edwardsiella tarda*, a pathogen known to cause extraintestinal diseases in fish and mammals, were shown to exhibit a reduced capacity to multiply within phagocytes, a lower replication rate in

serum and an overall reduced virulence. (Srinivasa Rao, *et al.*, 2003). Proteome comparative studies of *E. tarda* wild-type strain and its *pst* mutant revealed that translocon proteins of type III secretion system (T3SS) as well as other virulence proteins were absent in the *pst* mutant (Rao, *et al.*, 2004). The Pst system also influences other virulence mechanisms that are not limited to extraintestinal diseases. For example, a *pst* mutant of an intestinal *E. coli* pathogenic strain was shown to cause significantly less attaching and effacing lesions in a pig ileal explant model (Batisson, *et al.*, 2003). In *Shigella flexneri*, a *pst* mutation reduced the capacity to form plaques on Henle cell monolayers in a Pho regulon-dependent manner. The capacity to form plaques is a characteristic associated with *Shigella* virulence (Runyen-Janecky, *et al.*, 2005). In contrast, an entero-invasive *E. coli* *pst* mutant showed hyper-invasiveness of Hep-2 cells (Sinai & Bavoil, 1993). Lastly, as observed with *E. tarda*, the PhoR/PhoB TCRS is involved in the expression of T3SS-related genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Lucas, *et al.*, 2000, Baxter & Jones, 2005). Those studies indicate that the Pst system can function as a regulator of bacterial pathogenicity.

## **2. PhoBR inactivation and virulence**

As the Pst mutations result in a constitutive activation of the Pho regulon, it is likely that their effects on virulence are mediated through the PhoR/PhoB TCRS. Therefore, inactivation of *phoBR* should also have an effect on virulence. Indeed, this was shown to be the case. It has for instance been shown that ChvI, a PhoB homolog, is essential for expression of full virulence of *Agrobacterium tumefaciens* (Mantis & Winans, 1993). In

comparative microarray analyses of the responses of *Corynebacterium glutamicum* and its isogenic *phoRS* (*phoBR* homolog) mutant after a shift to P<sub>i</sub>-limiting conditions virulence-related genes such as siderophore systems are differentially expressed (Kocan, *et al.*, 2006). Many gene products that may be associated with virulence are overexpressed in the *Vibrio cholerae* O1 wild-type strain compared to its isogenic *phoB* mutant, e. g., haemolysin (von Kruger, *et al.*, 1999, von Kruger, *et al.*, 2006). Furthermore, a *V. cholerae phoB* mutant showed a decreased capacity for colonization of adult rabbit ligated ileal loops in competitive colonization assays with the wild-type strain. This result is somewhat puzzling because the small intestine has a high phosphate concentration and the Pho regulon would be expected to be repressed in wild-type strains in those conditions. This raises the possibility that stimuli encountered in the small intestine, other than the phosphate signal, may be responsible for those observations. Lastly, phosphate has recently been demonstrated to be a major signal for sporulation of *Clostridium perfringens* and for *C. perfringens* endotoxin (CPE) production (Philippe, *et al.*, 2006). Taken together, these studies reinforce the notion that PhoB may act not only as a RR for phosphate homeostasis but also in modulation of virulence attributes.

#### **IV. How can the Pho regulon influence pathogenesis?**

Information summarized above illustrates that complex networking events occur when control of the Pho regulon is altered. Orchestrated regulation of the Pho regulon seems to occur during different steps of bacterial pathogenesis. Furthermore, some studies suggest that the PhoR/PhoB TCRC

responds to stimuli other than phosphate and that a subset of Pho regulon genes is activated or repressed by other transcriptional regulators. The next sections shed light on strategies implicating the Pho regulon which permit survival in adverse conditions encountered in pathogenesis and environmental stresses. This can be illustrated by responses of the Pho regulon to pH variation and its role in biofilm formation. Moreover, as reported above, the Pho regulon has regulatory links with cell surface components such as lipids and exopolysaccharides, which may have important consequences on bacterial virulence.

### **1. Pho regulon and response to acid stress**

The Pho regulon includes also genes that do not appear to be directly implicated in the cell phosphate management, including one related to acid stress, which bacteria must overcome to maintain homeostasis. For example, the acid-inducible *asr* gene is under the transcriptional control of the PhoR/PhoB TCRS in *E. coli*. Asr is thought to play a role similar to that of the *E. coli* periplasmic protein HdeA, which serves as a proton sink or a chaperone for protecting periplasmic proteins from the deleterious effects of low pH (Gajiwala & Burley, 2000). As another example, the PhoR/PhoB TCRS has been suggested to sense external acidity and to regulate the transcription of genes that are important for acid shock resistance (Suziedeliene, *et al.*, 1999, Tucker, *et al.*, 2002, Seputiene, *et al.*, 2003, Seputiene, *et al.*, 2004, Seputiene, *et al.*, 2006). In contrast, a pH shift from 4.5 to 5.8 increases *pst* transcription in *C. acetobutylicum* (Fischer, *et al.*, 2006). However, other members of the Pho regulon, such as *phoA*, are not

induced in alkaline conditions, as demonstrated by use of a *lacZ* fusion and microarray experiments (Novak, *et al.*, 1999, Atalla & Schumann, 2003). This can be explained by a differential expression of the Pho regulon genes, depending on the nature of the signal. In light of the observations in these studies, the PhoR/PhoB TCRS is likely to be a key component of a circuit involved in the response to acid stresses. During their life cycle, many bacterial pathogens face acid stress. Enteric pathogens must survive stomach acidity while invasive bacteria must be able to survive endosomal acidified environment. Thus, mutations in the Pst system or *phoB* can reduce virulence by affecting the response to acid stress.

## **2. Biofilms and Pho regulon**

In natural environments, most microorganisms have a sessile life-style and live in complex structures called biofilms, which are mixed microbial populations typically embedded in a matrix of extracellular polymers. In pathogenesis, biofilms play many important roles. Biofilms lead to resistance to environmental stresses such as exposure to biocides and antimicrobial agents and to increase in concentration of virulence factors in a precise environment such as in a host tissue. Also, biofilms enhance genetic exchange of virulence elements. Additionally, biofilms serve as a reservoir that favors the preservation and the spreading of bacterial pathogens (Davey & O'Toole G, 2000). Some studies showed a relationship between the Pho regulon and biofilm formation. For example, a Pst mutation abolishes biofilm formation in two rhizosphere-colonizing bacteria, *Pseudomonas aerofaciens* and *P. fluorescens* (Monds, *et al.*, 2001).

Recently, Monds and co-workers (2007) demonstrated that in *P. fluorescens*, RapA has a c-di-GMP phosphodiesterase activity mostly responsible for the inhibition of biofilm formation in Pst mutants. This in turn inhibits the secretion of LapA, a large adhesin required for biofilm formation by *P. fluorescens*. Indeed, Pho modulation of c-di-GMP cellular level, via RapA activity, was showed to be linked to LapA adhesin decreased secretion as well as its increased dissociation from the bacterial cell surface (Monds, *et al.*, 2007). In the plant pathogen *A. tumefaciens*, PhoR/PhoB TCRS was shown to induce the production of larger biofilms in phosphate depleted conditions (Danhorn, *et al.*, 2004). Moreover, in *E. coli*, the Pho regulon was shown to be linked to quorum-sensing (Ren, *et al.*, 2004), a key regulator mechanism for the formation of biofilms (Parsek & Greenberg, 2005). PhoR/PhoB TCRS may therefore play a role in the virulence of bacteria via regulatory links with biofilm formation and quorum-sensing circuits.

### **3. Bacterial cell surface components and the Pho regulon**

The Pho regulon is involved in the regulation of some cell surface components modifications, i. e. teichuronic acid, phosphate free lipids, phospholipids, exopolysaccharides, adhesin (see above). Moreover we have found that lipid A and fatty acids composition is modified in Pst *E.coli* mutants (Lamarche *et al.* submitted). Interestingly, Pst mutants showed a reduced resistance to different host defence elements that target bacterial cell surface components. For instance, *pst* mutations reduce resistance to serum, acid and cationic antimicrobial peptides (Daigle, *et al.*, 1995,

Lamarche, *et al.*, 2005). Lipopolysaccharides, outer-membrane proteins and membrane lipids are known to be involved in the resistance to such host defence mechanisms. Thus, Pho-regulated modifications of these cell surface components may explain, at least in part, virulence attenuation of Pst mutants. Furthermore, as described above, many lines of evidence link the Pho regulon to the bacterial stress response. Indeed, because the cellular status of stress response molecules like poly P and ppGpp may be controlled by the PhoR/PhoB TCRS, virulence attributes, including some bacterial cell surface components, acid stress response and biofilm formation must also require an intact Pho regulon (Chang & Cronan, 1999, Hammer & Swanson, 1999, Kornberg, *et al.*, 1999, Primm, *et al.*, 2000, Rashid & Kornberg, 2000, Rashid, *et al.*, 2000, Taylor, *et al.*, 2002, Haralalka, *et al.*, 2003, Pizarro-Cerda & Tedin, 2004, Gaynor, *et al.*, 2005, Jain, *et al.*, 2006).

#### **4. Bacterial fitness and the Pho regulon**

The capacity of the bacterial cell to adapt to different environments is often associated with its ability to occupy different ecological niches including the animal host. For instance, expression of the Pho regulon could be advantageous to adapt to some conditions encountered at some stage in of the infectious process. PhoR/PhoB TCRS and Pho regulon are well documented as phosphate homeostasis circuitry but activation of PhoB by nonpartner HKs shows that cross-regulation leads to heterogeneity of the cell population (Zhou, *et al.*, 2005). In addition to specialized bacterial sensing mechanisms that perceive environmental cues, phenotypic diversity within genetically identical cell population contributes to the presence of

primed cells allowing rapid response to such cues, increasing the chance to survive new stresses. In this regard, it is tempting to speculate that the stochastic behavior of the Pho regulon characterized by a bimodal, “all-or-none,” pattern for gene expression can participate to an increased fitness in microenvironments encountered within human and animal hosts. Noise in gene expression and positive feedback regulation of the Pho regulon are likely to contribute to the emergence of multiple stable phenotypes within the cell population as stochastic expression of virulence factor genes per se is observed in many pathogens (Smits, *et al.*, 2006, Zhou, *et al.*, 2005).

### **Concluding remarks and perspectives**

As illustrated in this review, the Pho regulon controls and influences the expression of virulence traits in many bacterial species in addition to its role in phosphate homeostasis. Mutations in the Pst system or PhoB were shown to result in multiple effects including reduction of virulence. The effects of *pst* mutations can be due to a deficiency in phosphate uptake in some conditions but, in all cases, PhoR/PhoB TCRS regulation is likely to generate the multiple effects that are observed in the Pst and PhoB mutants. Moreover, the regulation of cell surface components by the Pho regulon may contribute to bacterial virulence. Additionally, a strong network of links exists between the Pho regulon and some stress responses. These phenomena have been observed in many bacterial species. Information presented in this review reflects the need to redefine our vision concerning the role of the bacterial Pho regulon. Instead of being the simple regulatory circuit controlling phosphate homeostasis, the Pho regulon should be



considered as a part of a complex network important for both bacterial virulence and stress response. Moreover, expression of Pho regulon genes is induced in particular conditions regardless of the bioavailability of  $P_i$ . This can be explained, in part, by stochastic variation in Pho-dependent gene expression. However, it could also indicate that other signals are perceived by PhoR/PhoB TCRS or that other TCRS regulate genes belonging to the Pho regulon.

The interplay between the Pho regulon (including the Pst system) and virulence, has often an unknown molecular basis, warranting the need for more comprehensive studies. High throughput genomic and proteomic analyses are providing some clues to the relationship between the Pho regulon and virulence (Table 1, Crépin, S., Lamarche M.G.L. *et al.* unpublished, von Kruger, *et al.*, 2006). As mentioned previously, several lines of evidence suggest that some PhoBR regulated genes are expressed within the host. However, little is known about the signals regulating the Pho regulon *in vivo*. The spatial and temporal patterns of Pho-dependent gene expression as well as the implication of non-partner HK in their regulation, within micro environments of the host, would give a better understanding on the role of the Pho regulon in pathogenesis. In conclusion, TCRSs are absent in animal and human cells, thus they represent choice targets for the development of therapeutics (Barrett, *et al.*, 1998, Stephenson & Hoch, 2004). A number of chemical inhibitors of TCRSs have been identified by screening libraries of synthetic compounds (Matsushita & Janda, 2002, Stephenson & Hoch, 2004). Drugs that interfere with the Pho

regulon activity may also be useful as therapeutic agents that would compromise bacterial virulence and facilitate elimination of the pathogen by host defences.

### Acknowledgements

We thank Michaël Mourez (Université de Montréal) and France Daigle (Université de Montréal) for their insightful comments and critical reading of the manuscript. We are also grateful to Éliane Auger for her grammatical revisions of the manuscript. The authors gratefully acknowledge the financial help of Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (Discovery grant to JH), FQRNT studentship (MGL) and National Institutes of Health (NIH GM62662 to BLW).

### References

- Atalla A & Schumann W (2003) The *pst* operon of *Bacillus subtilis* is specifically induced by alkali stress. *J Bacteriol* **185**: 5019-5022.
- Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y & Harashima S (2004) Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 17289-17294.
- Avison MB, Horton RE, Walsh TR & Bennett PM (2001) *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem* **276**: 26955-26961.
- Baek JH & Lee SY (2006) Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 104-109.
- Bahrani-Mougeot FK, Buckles EL, Lockett CV, Hebel JR, Johnson DE, Tang CM & Donnenberg MS (2002) Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli*

- virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol* **45**: 1079-1093.
- Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L & Leibler S (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622-1625.
- Bardin S, Dan S, Osteras M & Finan TM (1996) A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**: 4540-4547.
- Barrett JF, Goldschmidt RM, Lawrence LE, *et al.* (1998) Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5317-5322.
- Batisson I, Guimond MP, Girard F, *et al.* (2003) Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**: 4516-4525.
- Baxter MA & Jones BD (2005) The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**: 1377-1385.
- Beier D & Gross R (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**: 143-152.
- Blanco AG, Sola M, Gomis-Ruth FX & Coll M (2002) Tandem DNA recognition by PhoB, a two-component signal transduction transcriptional activator. *Structure (Camb)* **10**: 701-713.
- Bougdour A & Gottesman S (2007) ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12896-12901.
- Bougdour A, Wickner S & Gottesman S (2006) Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **20**: 884-897.
- Brown MR & Kornberg A (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16085-16087.
- Buckles EL, Wang X, Lockatell CV, Johnson DE & Donnenberg MS (2006) PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology* **152**: 153-160.

- Burall LS, Harro JM, Li X, *et al.* (2004) *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect Immun* **72**: 2922-2938.
- Chang YY & Cronan JE, Jr. (1999) Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 249-259.
- Chatterjee SS, Hossain H, Otten S, *et al.* (2006) Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **74**: 1323-1338.
- Chatterji D & Ojha AK (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr Opin Microbiol* **4**: 160-165.
- Daigle F, Fairbrother JM & Harel J (1995) Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect Immun* **63**: 4924-4927.
- Danhorn T, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR & Fuqua C (2004) Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J Bacteriol* **186**: 4492-4501.
- Darwin AJ & Miller VL (1999) Identification of *Yersinia enterocolitica* genes affecting survival in an animal host using signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **32**: 51-62.
- Davey ME & O'Toole G A (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847-867.
- Dozois CM, Daigle F & Curtiss R, 3rd (2003) Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 247-252.
- Dubail I, Berche P & Charbit A (2000) Listeriolysin O as a reporter to identify constitutive and *in vivo*-inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **68**: 3242-3250.
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED & Swain PS (2002) Stochastic gene expression in a single cell. *Science* **297**: 1183-1186.
- Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M & Hinton JC (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression

- profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**: 103-118.
- Faucher SP, Porwollik S, Dozois CM, McClelland M & Daigle F (2006) Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 1906-1911.
- Fischer RJ, Oehmcke S, Meyer U, Mix M, Schwarz K, Fiedler T & Bahl H (2006) Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J Bacteriol* **188**: 5469-5478.
- Fisher SL, Jiang W, Wanner BL & Walsh CT (1995) Cross-talk between the histidine protein kinase VanS and the response regulator PhoB. Characterization and identification of a VanS domain that inhibits activation of PhoB. *J Biol Chem* **270**: 23143-23149.
- Gajiwala KS & Burley SK (2000) HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J Mol Biol* **295**: 605-612.
- Gaynor EC, Wells DH, MacKichan JK & Falkow S (2005) The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Mol Microbiol* **56**: 8-27.
- Geiger O, Rohrs V, Weissenmayer B, Finan TM & Thomas-Oates JE (1999) The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol* **32**: 63-73.
- Ghorbel S, Kormanec J, Artus A & Virolle MJ (2006) Transcriptional studies and regulatory interactions between the *phoR-phoP* operon and the *phoU*, *mtpA*, and *ppk* genes of *Streptomyces lividans* TK24. *J Bacteriol* **188**: 677-686.
- Gonin M, Quardokus EM, O'Donnol D, Maddock J & Brun YV (2000) Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **182**: 337-347.
- Grant AJ, Coward C, Jones MA, Woodall CA, Barrow PA & Maskell DJ (2005) Signature-tagged transposon mutagenesis studies demonstrate the

- dynamic nature of cecal colonization of 2-week-old chickens by *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8031-8041.
- Haldimann A, Prahald MK, Fisher SL, Kim SK, Walsh CT & Wanner BL (1996) Altered recognition mutants of the response regulator PhoB: a new genetic strategy for studying protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14361-14366.
- Hammer BK & Swanson MS (1999) Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol Microbiol* **33**: 721-731.
- Han JS, Park JY, Lee YS, Thony B & Hwang DS (1999) PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **262**: 448-452.
- Haralalka S, Nandi S & Bhadra RK (2003) Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors. *J Bacteriol* **185**: 4672-4682.
- Harel J, Forget C, Ngeleka M, Jacques M & Fairbrother JM (1992) Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K:-F165. *J Gen Microbiol* **138 (Pt 11)**: 2337-2345.
- Harris RM, Webb DC, Howitt SM & Cox GB (2001) Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5008-5014.
- Hava DL & Camilli A (2002) Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **45**: 1389-1406.
- Hengge-Aronis R (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 373-395, table of contents.
- Hoch JA (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**: 165-170.
- Hunt TA, Kooi C, Sokol PA & Valvano MA (2004) Identification of *Burkholderia cenocepacia* genes required for bacterial survival *in vivo*. *Infect Immun* **72**: 4010-4022.
- Jain V, Kumar M & Chatterji D (2006) ppGpp: stringent response and survival. *J Microbiol* **44**: 1-10.

- Kato J, Yamamoto T, Yamada K & Ohtake H (1993) Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. *Gene* **137**: 237-242.
- Kaern M, Elston TC, Blake WJ & Collins JJ (2005) Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat Rev Genet* **6**: 451-464.
- Khan MA & Isaacson RE (2002) Identification of *Escherichia coli* genes that are specifically expressed in a murine model of septicemic infection. *Infect Immun* **70**: 3404-3412.
- Kim SK, Wilmes-Riesenberg MR & Wanner BL (1996) Involvement of the sensor kinase EnvZ in the *in vivo* activation of the response-regulator PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol* **22**: 135-147.
- Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H & Mori H (2005) Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* **12**: 291-299.
- Klauck E, Typas A & Hengge R (2007) The sigma<sup>S</sup> subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci Prog* **90**: 103-127.
- Kocan M, Schaffer S, Ishige T, Sorger-Herrmann U, Wendisch VF & Bott M (2006) Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. *J Bacteriol* **188**: 724-732.
- Kornberg A, Rao NN & Ault-Riche D (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* **68**: 89-125.
- Lamarche MG, Dozois CM, Daigle F, Caza M, Curtiss R, 3rd, Dubreuil JD & Harel J (2005) Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* **73**: 4138-4145.
- Lathem WW, Crosby SD, Miller VL & Goldman WE (2005) Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology, and bacterial transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17786-17791.

- Lawlor MS, Hsu J, Rick PD & Miller VL (2005) Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Mol Microbiol* **58**: 1054-1073.
- Lestrade P, Delrue RM, Danese I, *et al.* (2000) Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* **38**: 543-551.
- Loewen PC, Hu B, Strutinsky J & Sparling R (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* **44**: 707-717.
- Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL & Lee CA (2000) Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **182**: 1872-1882.
- Magnusson LU, Farewell A & Nystrom T (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242.
- Mantis NJ & Winans SC (1993) The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli* *phoB* mutation and is required for virulence. *J Bacteriol* **175**: 6626-6636.
- Marra A, Asundi J, Bartilson M, *et al.* (2002) Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infect Immun* **70**: 1422-1433.
- Matsushita M & Janda KD (2002) Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. *Bioorg Med Chem* **10**: 855-867.
- McKean S, Davies J & Moore R (2005) Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction. *Microbes Infect* **7**: 1352-1363.
- Mendrygal KE & Gonzalez JE (2000) Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**: 599-606.
- Merrell DS, Hava DL & Camilli A (2002) Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **43**: 1471-1491.
- Monds RD, Silby MW & Mahanty HK (2001) Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* **42**: 415-426.



- Monds RD, Newell PD, Gross RH & O'Toole GA (2007) Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63**: 656-679.
- Ngeleka M, Harel J, Jacques M & Fairbrother JM (1992) Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect Immun* **60**: 5048-5056.
- Nishino K, Honda T & Yamaguchi A (2005) Genome-wide analyses of *Escherichia coli* gene expression responsive to the BaeSR two-component regulatory system. *J Bacteriol* **187**: 1763-1772.
- Novak R, Cauwels A, Charpentier E & Tuomanen E (1999) Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol* **181**: 1126-1133.
- Oganesyan V, Oganesyan N, Adams PD, Jancarik J, Yokota HA, Kim R & Kim SH (2005) Crystal structure of the "PhoU-like" phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. *J Bacteriol* **187**: 4238-4244.
- Ozbudak EM, Thattai M, Kurtser I, Grossman AD & van Oudenaarden A (2002) Regulation of noise in the expression of a single gene. *Nat Genet* **31**: 69-73.
- Parsek MR & Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 27-33.
- Paul BJ, Berkmen MB & Gourse RL (2005) DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7823-7828.
- Pedraza JM & van Oudenaarden A (2005) Noise propagation in gene networks. *Science* **307**: 1965-1969.
- Philippe VA, Mendez MB, Huang IH, Orsaria LM, Sarker MR & Grau RR (2006) Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen *Clostridium perfringens*. *Infect Immun* **74**: 3651-3656.

- Pizarro-Cerda J & Tedin K (2004) The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **52**: 1827-1844.
- Polissi A, Pontiggia A, Feger G, Altieri M, Mottl H, Ferrari L & Simon D (1998) Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **66**: 5620-5629.
- Pragai Z, Allenby NE, O'Connor N, Dubrac S, Rapoport G, Msadek T & Harwood CR (2004) Transcriptional regulation of the *phoPR* operon in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 1182-1190.
- Primm TP, Andersen SJ, Mizrahi V, Avarbock D, Rubin H & Barry CE, 3rd (2000) The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol* **182**: 4889-4898.
- Rao NN & Kornberg A (1999) Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol* **23**: 183-195.
- Rao PS, Yamada Y, Tan YP & Leung KY (2004) Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Mol Microbiol* **53**: 573-586.
- Raser JM & O'Shea EK (2005) Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science* **309**: 2010-2013.
- Rashid MH & Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4885-4890.
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH & Kornberg A (2000) Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9636-9641.
- Ren D, Bedzyk LA, Ye RW, Thomas SM & Wood TK (2004) Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2038-2043.
- Ruberg S, Puhler A & Becker A (1999) Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology* **145** ( Pt 3): 603-611.

- Ruiz N & Silhavy TJ (2003) Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates *rpoS* translation in an Hfq-dependent fashion. *J Bacteriol* **185**: 5984-5992.
- Runyen-Janecky LJ & Payne SM (2002) Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infect Immun* **70**: 4379-4388.
- Runyen-Janecky LJ, Boyle AM, Kizzee A, Liefer L & Payne SM (2005) Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **73**: 1404-1410.
- Sarubbi E, Rudd KE, Xiao H, Ikehara K, Kalman M & Cashel M (1989) Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **264**: 15074-15082.
- Schurdell MS, Woodbury GM & McCleary WR (2007) Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J Bacteriol* **189**: 1150-1153.
- Seputiene V, Daugelavicius A, Suziedelis K & Suziedeliene E (2006) Acid response of exponentially growing *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Res* **161**: 65-74.
- Seputiene V, Suziedelis K, Normark S, Melefors O & Suziedeliene E (2004) Transcriptional analysis of the acid-inducible *asr* gene in enterobacteria. *Res Microbiol* **155**: 535-542.
- Seputiene V, Motiejunas D, Suziedelis K, Tomenius H, Normark S, Melefors O & Suziedeliene E (2003) Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *J Bacteriol* **185**: 2475-2484.
- Sinai AP & Bavoil PM (1993) Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **10**: 1125-1137.
- Smith MW & Payne JW (1992) Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **79**: 183-190.
- Smits WK, Kuipers OP & Veening JW (2006) Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat Rev Microbiol* **4**: 259-271.

- Spira B & Yagil E (1999) The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **38**: 80-85.
- Spira B & Yagil E (1998) The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**: 469-477.
- Spira B, Silberstein N & Yagil E (1995) Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol* **177**: 4053-4058.
- Srinivasa Rao PS, Lim TM & Leung KY (2003) Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Infect Immun* **71**: 1343-1351.
- Stephenson K & Hoch JA (2004) Developing inhibitors to selectively target two-component and phosphorelay signal transduction systems of pathogenic microorganisms. *Curr Med Chem* **11**: 765-773.
- Summers ML, Denton MC & McDermott TR (1999) Genes coding for phosphotransacetylase and acetate kinase in *Sinorhizobium meliloti* are in an operon that is inducible by phosphate stress and controlled by *phoB*. *J Bacteriol* **181**: 2217-2224.
- Sun G, Birkey SM & Hulett FM (1996) Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 941-948.
- Suziedeliene E, Suziedelis K, Garbenciute V & Normark S (1999) The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *J Bacteriol* **181**: 2084-2093.
- Talaat AM, Lyons R, Howard ST & Johnston SA (2004) The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4602-4607.
- Taschner NP, Yagil E & Spira B (2004) A differential effect of sigmaS on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**: 2985-2992.
- Taschner NP, Yagil E & Spira B (2006) The effect of IHF on sigmaS selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* **185**: 234-237.

- Taylor CM, Beresford M, Epton HA, Sigee DC, Shama G, Andrew PW & Roberts IS (2002) *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J Bacteriol* **184**: 621-628.
- Tucker DL, Tucker N & Conway T (2002) Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 6551-6558.
- Valdivia RH & Falkow S (1997) Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* **277**: 2007-2011.
- Van Dien SJ & Keasling JD (1998) A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. *J Theor Biol* **190**: 37-49.
- VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL & Neidhardt FC (1996) Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 4344-4366.
- Verhamme DT, Arents JC, Postma PW, Crielaard W & Hellingwerf KJ (2002) Investigation of *in vivo* cross-talk between key two-component systems of *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 69-78.
- von Kruger WM, Humphreys S & Ketley JM (1999) A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* **145**: 2463-2475.
- von Kruger WM, Lery LM, Soares MR, *et al.* (2006) The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* **6**: 1495-1511.
- Wagner JK, Setayeshgar S, Sharon LA, Reilly JP & Brun YV (2006) A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 11772-11777.
- Wanner BL (1990) Phosphorus assimilation and its control of gene expression in *Escherichia coli*. *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism* (Hauska G & Thauer R, eds), pp. 152-163. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Wanner BL (1992) Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *J Bacteriol* **174**: 2053-2058.

- Wanner BL (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**: 47-54.
- Wanner BL (1995) Signal Transduction and Cross Regulation in the *Escherichia coli* Phosphate Regulon by PhoR, CreC, and Acetyl Phosphate. *Two-component Signal Transduction* (Hoch JA & Silhavy TA, eds), pp. 203-221. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Wanner BL (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Vol. 1 (Neidhardt RCI, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, & Umbrager HE, eds), pp. 1357-1381. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wanner BL (1997) Phosphate signaling and the control of gene expression in *Escherichia coli*. *Metal ions in gene regulation* (Silver S & William W, eds), pp. 104-128. Springer.
- Wanner BL & Wilmes-Riesenberg MR (1992) Involvement of phosphatransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 2124-2130.
- Wanner BL, Wilmes MR & Young DC (1988) Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 phoR mutant by adenyl cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon. *J Bacteriol* **170**: 1092-1102.
- Wanner BL, Weihong, J. Kim, S.K., Yamagata, S., Haldimann, A., Daniels, L.L. (1996) Are the multiple signal transduction pathways of the Pho regulon due to cross talk or cross regulation? *Regulation of gene expression in Escherichia coli* (Lin ECC & Lynch AS, eds), pp. 297-315. R.G. Landes Co., Austin, TX.
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF & Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**: 1591-1603.

- West AH & Stock AM (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **26**: 369-376.
- Wilmes-Riesenberg MR & Wanner BL (1992) Tn*phoA* and Tn*phoA'* elements for making and switching fusions for study of transcription, translation, and cell surface localization. *J Bacteriol* **174**: 4558-4575.
- Yang S, Perna NT, Cooksey DA, *et al.* (2004) Genome-wide identification of plant-upregulated genes of *Erwinia chrysanthemi* 3937 using a GFP-based IVET leaf array. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 999-1008.
- Yuan ZC, Zaheer R & Finan TM (2006) Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**: 1089-1102.
- Yuan ZC, Zaheer R, Morton R & Finan TM (2006) Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **34**: 2686-2697.
- Zhao Y, Blumer SE & Sundin GW (2005) Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol* **187**: 8088-8103.
- Zhou L, Grégori G, Blackman JM, Robinson JP & Wanner BL (2005) Stochastic activation of the response regulator PhoB by noncognate histidine kinases. *Journal of Integrative Bioinformatics* **2(1)**: 11-24.  
*Online journal*: [http://journal.imbio.de/index.php?paper\\_id=11](http://journal.imbio.de/index.php?paper_id=11)

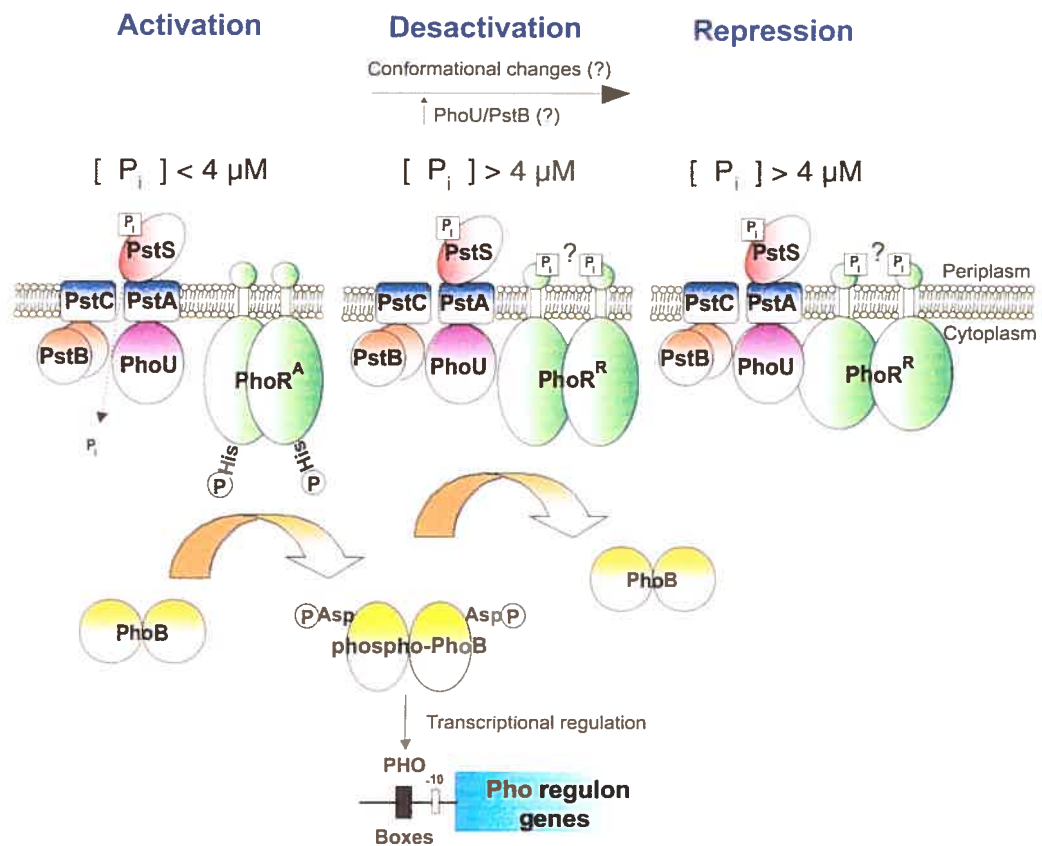
Table 1 Identification of *in vivo* expressed PhoB-dependent genes using infection models

Species	Infection models <sup>a</sup>	Selection <sup>b</sup>	References
<i>Brucella melitensis</i>	Mouse (BALB/c)septicemia	STM	(Lestrade, <i>et al.</i> , 2000)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Rat (Sprague-Dawley) chronic lung	STM	(Hunt, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Chicken (SPF Light Sussex) intestinal Human cells (INT407)	STM	(Grant, <i>et al.</i> , 2005)
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Mouse macrophage-like cells (J774A.1)	Microarray	(Gaynor, <i>et al.</i> , 2005)
<i>Escherichia coli</i>	Mouse (CBA) UTI	DFI	(McKean, <i>et al.</i> , 2005)
	Mouse septicemia (ICR)	STM	(Baltrani-Mougeot, <i>et al.</i> , 2002)
	Chicken (Leghorn SPF) extraintestinal	IVET	(Khan & Isaacson, 2002)
	Immature pears necrotic disease	SCOTS	(Dozois, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Erwinia amylovora</i>	Spinach leaf disease	IVET	(Zhao, <i>et al.</i> , 2005)
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Mouse (ICR Swiss) septicemia	IVET	(Yang, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Murine macrophage cells (P388D1)	IVET	(Dubail, <i>et al.</i> , 2000)
	Mouse (C57Bl/6j) intranasal	Microarray	(Chatterjee, <i>et al.</i> , 2006)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Mouse (BALB/c and BALB/c <sup>scid scid</sup> ) Lung	STM	(Lawlor, <i>et al.</i> , 2005)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mouse (CBA) UTI	Microarray	(Talaat, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Proteus mirabilis</i>	Mouse macrophage-like cells (RAW 264.7)	STM	(Burrall, <i>et al.</i> , 2004)
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Mouse macrophage-like cells (J774-A.1)	DFI	(Valdivia & Falkow, 1997)
<i>Salmonella Typhi</i>	Human monocyte cells (THP-1)	Microarray	(Eriksson, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Shigella flexneri</i>	Human intestinal cells (INT407)	SCOTS	(Faucher, <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Mouse (BALB/c) pneumonia and septicemia	DFI	(Runyen-Janecky & Payne, 2002)
	Mouse (Swiss Webster) bacteremia and nasopharyngeal carriage	STM	(Polissi, <i>et al.</i> , 1998)
	Mouse (CD-1) RTI	STM	(Hava & Camilli, 2002)
<i>Vibrio cholerae</i>	Mouse (CD-1) sucking	DFI	(Marra, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Mouse (BALB/c) intestinal and septicemia	STM	(Merrill, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Yersinia pestis</i>	Mouse (C57Bl/6) RTI	STM	(Darwin & Miller, 1999)
		Microarray	(Latham, <i>et al.</i> , 2005)

<sup>a</sup> Animal strains or cell lines used in the study are given in parentheses. UTI, urinary tract infection. RTI, respiratory tract infection.

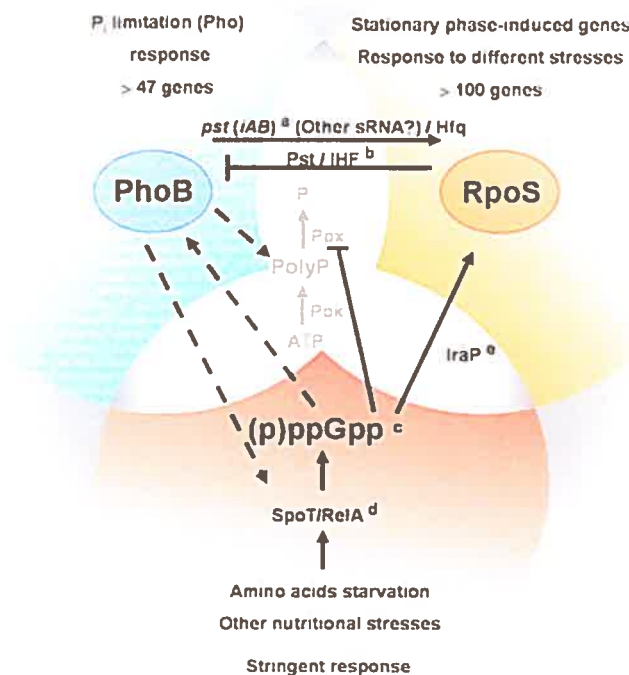
<sup>b</sup> STM, signature-tagged mutagenesis. DFI, differential fluorescence induction. IVET, *in vivo* expression technology. SCOTS, selective capture of transcribed sequences.





**FIGURE 1.**

Control of the Pho regulon and transmembrane signal transduction by environmental inorganic phosphate ( $P_i$ ). Adapted from Wanner (1997) (Figure 5.6; p. 116), with kind permission of Springer Science and Business Media. Small squares mark a  $P_i$  binding site on PstS and a hypothetical regulatory site on PhoR. Notation: PhoB, RR; PhoR, sensor protein (A, autophosphorylated; R, repression); PstA and PstC, integral membrane channel proteins; PstB, traffic ATPase; PstS, periplasmic  $P_i$ -binding protein; PhoU, regulatory protein. See text for details. This model is adopted from one that was originally illustrated in Wanner (1990) and modified in Wanner (1995, 1996).



**FIGURE 2.**

Scheme illustrating interactions between the Pho regulon, Poly P biosynthesis pathway, RpoS, and the stringent response major factors. Dashed lines represent interactions that could be either direct or indirect. <sup>a</sup> Represents the intergenic region between the *pstA* and *pstB* genes (*iAB*) of the *pst* operon processed mRNA (Ruiz & Silhavy, 2003, Schurdell, *et al.*, 2007). <sup>b</sup> RpoS contributes in turning off the Pho regulon by directly stimulating, in a IHF dependent manner, the expression of the *pst* operon (Spira & Yagil, 1999, Taschner, *et al.*, 2004, Taschner, *et al.*, 2006). <sup>c</sup> Basal level of cellular ppGpp is

essential for proper Pho regulon expression. Moreover, induction of the Pho regulon is observed concomitantly with ppGpp synthesis, until a certain threshold is reached; i.e. a ppGpp intracellular concentration that induces inhibition of protein synthesis (Spira, *et al.*, 1995, Spira & Yagil, 1998).<sup>d,e</sup> Phosphate limitation induces SpoT-dependent ppGpp accumulation (Spira, *et al.*, 1995, Spira & Yagil, 1998). This promotes transcription of a *iraP* gene coding for the anti-adaptor IraP that interferes with the delivery of RpoS to the ClpXP protease by blocking the action of RssB, an adaptor protein for RpoS degradation (Bougdour & Gottesman, 2007, Bougdour *et al.*, 2006). In phosphate limiting condition, a *phoB* mutant accumulates two fold less *iraP* transcript but still, RpoS is stabilized in an IraP-dependent manner (Bougdour & Gottesman, 2007, Bougdour *et al.*, 2006). Information about the Pho regulon, RpoS, Poly P and ppGpp is given in the text.

## DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES<sup>1</sup>

### IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Martin Lamarche	<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Faculté</b> Faculté de médecine vétérinaire	<b>Département</b> Pathologie et microbiologie
<b>Programme</b> Doctorat en sciences vétérinaires	<b>Option</b> Microbiologie

### ARTICLES PROPOSES

1.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche, Charles M. Dozois, France Daigle, Mélissa Caza, Roy Curtiss III, J. Daniel Dubreuil et Josée Harel	
<b>Titre</b> Inactivation of the Pst System Reduces the Virulence of an Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> O78 strain	
<b>Revue</b> Infection and Immunity	<b>État</b> Publié

2.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche, Sang-Hyun Kim, Sébastien Crépin, Michael Mourez, Nicolas Bertrand, Russell E. Bishop, J. Daniel Dubreuil et Josée Harel	
<b>Titre</b> Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under <i>Escherichia coli</i> phosphate (Pho) regulon activation	
<b>Revue</b> Journal of Bacteriology	<b>État</b> En préparation

3.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche et Josée Harel	
<b>Titre</b> Growth Phase-dependent Membrane Perturbations Occur in a <i>Escherichia coli</i> Phosphate Specific Transport (Pst) Mutant Strain	
<b>Revue</b> Journal of Bacteriology	<b>État</b> En préparation

4.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche, Barry L. Wanner, Sébastien Crépin et Josée Harel	
<b>Titre</b> The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis	
<b>Revue</b> FEMS Microbiology Review	<b>État</b> Soumis pour publication

## DECLARATION DE L'ETUDIANT

### Déclaration

1. J'ai construit le mutant *pst* isogénique de la souche de *E. coli* aviaire pathogène  $\chi$ 7122. Ce mutant fut utilisé lors des différentes expériences contenues dans cette étude et dans l'article 2. Les expériences utilisant le modèle expérimental d'infection de poulet furent effectuées par le Dr Charles Dozois et Mélissa Caza dans les laboratoires du Dr Roy Curtiss III à la Washington University à St-Louis. J'ai effectué la totalité des autres expériences (tests de résistance au sérum, à l'acidité et à la polymyxine, analyses transcriptomiques par RT-PCR et analyses des lipopolysaccharides par gel d'acrylamide). J'ai rédigé la totalité de l'article incluant l'analyse des résultats et l'élaboration de la discussion.
2. J'ai effectué les tests de résistance à la polymyxine et les analyses des lipopolysaccharides par gel d'acrylamide et immunobuvardage de type Western. J'ai effectué les extractions de lipide A en vue des analyses spectrométriques (MALDI-TOF). Sang-Hyun Kim a effectué les analyses du lipide A radiomarké en chromatographie sur couche mince (TLC) dans le laboratoire du Dr Russel Bishop à l'Université de Toronto. Nicolas Bertrand a effectué les tests de résistance à la cécropine. Sébastien Crépin a effectué les tests de résistance à la vancomycine. Certaines données de transcriptomique comparative entre la souche  $\chi$ 7122 et le mutant *pst*, provenant d'analyses par puce à ADN conduites par S. Crépin (travaux de maîtrise), furent utilisées. J'ai rédigé la totalité de l'article incluant l'analyse de tous les résultats et l'élaboration de la discussion.
3. J'ai effectué les tests de résistance à l'acidité et les analyses de perméabilité membranaire. Les données de chromatographie gazeuse (GC) proviennent d'expériences effectuées par Céline Forget, une technicienne qui travaillait dans notre laboratoire. J'ai rédigé la totalité de l'article incluant l'analyse des résultats et l'élaboration des éléments de discussion.
4. J'ai rédigé la totalité de cet article de revue, ce qui implique la recherche bibliographique et l'intégration de différentes notions et données théoriques à un contexte global. Sébastien Crépin a fait une recension des manuscrits faisant l'objet d'expériences *in vivo* ayant identifié certains gènes d'intérêts (Tableau 1). J'ai collaboré avec le Dr Wanner de la Purdue University afin de réaliser une simulation stochastique de l'expression génique dans le but de les

Date

03-12-07

### AVIS DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

#### Déclaration

Martin Lamarche a acquis des connaissances dans plusieurs domaines de la pathogénie moléculaire bactérienne et a accompli des travaux qui sont de niveau doctoral.

Signature

Nom

Date

# ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE<sup>1</sup>

## IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

<b>Nom de l'étudiant</b> Martin Lamarche		<b>Code permanent</b> [REDACTED]
<b>Sigle du programme</b> Ph.D.	<b>Titre du programme</b> Sciences vétérinaires	<b>Option</b> Microbiologie

## DESCRIPTION DES ARTICLES

1.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche, Charles M. Dozois, France Daigle, Mélissa Caza, Roy Curtiss III, J. Daniel Dubreuil et Josée Harel	
<b>Titre</b> Inactivation of the Pst System Reduces the Virulence of an Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> O78 strain	
<b>Revue</b> Infection and Immunity	<b>Date de publication</b> Juillet 2005

2.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche, Sang-Hyun Kim, Sébastien Crépin, Michael Mourez, Nicolas Bertrand, Russell E. Bishop, J. Daniel Dubreuil et Josée Harel	
<b>Titre</b> Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under <i>Escherichia coli</i> phosphate (Pho) regulon activation	
<b>Revue</b> Journal of Bacteriology	<b>Date de publication</b> En préparation

3.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche et Josée Harel	
<b>Titre</b> Growth Phase-dependent Membrane Perturbations Occur in a <i>Escherichia coli</i> Phosphate Specific Transport (Pst) Mutant Strain	
<b>Revue</b> Journal of Bacteriology	<b>Date de publication</b> En préparation

4.

<b>Auteurs</b> Martin G. Lamarche, Barry L. Wanner, Sébastien Crépin et Josée Harel	
<b>Titre</b> The Pho regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis	
<b>Revue</b> FEMS Microbiology Review	<b>Date de publication</b> Soumis pour publication

**Déclaration**

À titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que **Martin Lamarche** inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre :

*Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne*

<b>Coauteur</b> Nicolas Bertrand	[Signature]	<b>Date</b> 06-09-2007
<b>Coauteur</b> Russell Bishop	<b>Signature</b>	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b> Mélicca Caza	[Signature]	<b>Date</b> 14-09-2007
<b>Coauteur</b> Sébastien Crépin	[Signature]	<b>Date</b> 06-09-2007
<b>Coauteur</b> Roy Curtiss III	[Signature]	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b> France Daigle	[Signature]	<b>Date</b> 13-9-2007
<b>Coauteur</b> Charles Dozois	[Signature]	<b>Date</b> 14-09-07
<b>Coauteur</b> Daniel Dubreuil	[Signature]	<b>Date</b> 06-09-07
<b>Coauteur</b> Josée Harel	[Signature]	<b>Date</b> 06-09-07
<b>Coauteur</b> Sang-Hyun Kim	[Signature]	<b>Date</b>
<b>Coauteur</b> Michaël Mourez	[Signature]	<b>Date</b> 06-09-07
<b>Coauteur</b> Barry Wanner	[Signature]	<b>Date</b>

**Déclaration**

A titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que **Martin Lamarche** inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre :

*Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne*

Coauteur  
Russell Bishop



Date

Sept 24 07



<b>Déclaration</b>	
A titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que <b>Martin Lamarche</b> inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre :	
<i>Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne</i>	
Coauteur Roy Curtiss III	Date 9-18-7



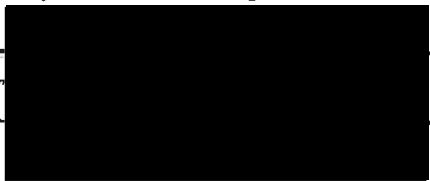
**Déclaration**

A titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Martin Lamarche inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre :

*Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne*

Coauteur  
Sang-Hyun Kim

Signature



Date

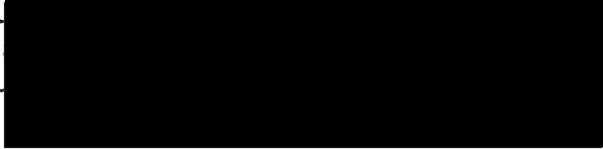
09/19/2009

**Déclaration**

A titre de coauteurs des articles identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage de la thèse et nous sommes d'accord que Martin Lamarche inclut ces articles dans sa thèse de doctorat qui a pour titre :

*Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne*

**Coputeur**  
Barry Wanner



**Date**  
9/29/2007

**EDITOR PERMISSION FOR THESIS REPRODUCTION AND INCLUSION OF A MANUSCRIPT IN A DOCTORAL THESIS**

SEP 11 2007  
*Revised*

STUDENT IDENTIFICATION



**Student name**  
Martin Lamarche  
**Program**  
Ph.D.

**Code permanent**  
[Redacted]  
**Option**  
Microbiologie

**ARTICLE DESCRIPTION**

<b>Authors</b> Martin G. Lamarche, Charles M. Dozois, France Daigle, Mélissa Caza, Roy Curtiss III, J. Daniel Dubreuil et Josée Harel		
<b>Title</b> Inactivation of the Pst System Reduces the Virulence of an Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> O78 strain		
<b>Volume and number</b> Vol. 73, No 7	<b>Pages</b> 4138-4145	<b>Date</b> July 2005

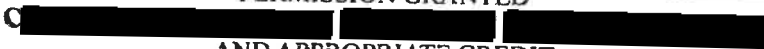
**JOURNAL**

<b>Name of the journal</b> Infection and Immunity
<b>Address</b> Journal Dept., American Society for Microbiology, 1752 N Street, N.W., Washington, DC 20036-2904, USA

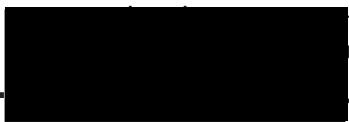
**EDITOR DECLARATION**

<b>Complete name of the editor</b> [Redacted]		
<b>Declaration</b> As editor, I authorize microfilm reproduction of the thesis and I agree that <b>Martin Lamarche</b> includes this manuscript in his doctoral thesis entitled:  <i>Étude du rôle du régulon Phosphate (Pho) dans la virulence de souches d'Escherichia coli pathogènes causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) et de son influence sur la surface bactérienne</i>		
<b>Editor</b> [Redacted]	<b>Signature</b> [Redacted]	<b>Date</b> [Redacted]

PERMISSION GRANTED



AND APPROPRIATE CREDIT



Microbiology  
Department  
Date 9-11-07

FMV-SAC 2001 06