



HAL
open science

Function of the post-transcriptional regulator CSR during the metabolic adaptation of the model bacteria *Escherichia coli*

Manon Morin

► **To cite this version:**

Manon Morin. Function of the post-transcriptional regulator CSR during the metabolic adaptation of the model bacteria *Escherichia coli*. Genomics [q-bio.GN]. INSA de Toulouse, 2015. English. NNT : 2015ISAT0026 . tel-01395820

HAL Id: tel-01395820

<https://theses.hal.science/tel-01395820>

Submitted on 12 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Ingénieries microbienne et enzymatique

Présentée et soutenue par :

Manon Anglès-Morin

le mardi 10 Novembre 2015

Titre :

**Rôle du régulateur post-transcriptionnel CSR dans l'adaptation
métabolique de la bactérie modèle *Escherichia coli***

JURY

Dr. Eliane Hajnsdorf, Directrice de recherches, CNRS, Paris
Dr. Mickaël Desvaux, Directeur de recherches, INRA, Clermont-Ferrand
Dr. Jean-Pierre Mazat, Professeur émérite, CNRS, Bordeaux
Dr. Nic Lindley, Directeur de Recherches, CNRS, Toulouse
Dr. Muriel Coccagn-Bousquet, Directrice de recherche, INRA, Toulouse
Dr. Delphine Ropers, Chargée de recherches, Inria, Grenoble
Dr. Brice Enjalbert, Maître de conférences, membre invité, INSA, Toulouse

Ecole doctorale : SEVAB

Unité de recherche : LISBP UMR5504/792 – Inria Grenoble Rhône-Alpes

Directeur(s) de Thèse : Dr. Muriel Coccagn-Bousquet et Dr. Delphine Ropers

Rôle du régulateur post-transcriptionnel CSR dans l'adaptation métabolique de la bactérie modèle *Escherichia coli*

Dans son environnement, la bactérie hétérotrophe *Escherichia coli* (*E. coli*) fait face à d'importantes fluctuations des ressources carbonées. Une grande capacité d'adaptation métabolique lui permet de coloniser ou de subsister en fonction des substrats disponibles. Cette adaptation est régie par un réseau complexe de régulations de l'expression génique. Au sein de ce réseau, le régulateur global post-transcriptionnel CSR (Carbon Storage Regulator) régule la stabilité et/ou l'initiation de la traduction d'ARNm par l'intermédiaire de la protéine CsrA. Ce système, impliqué dans la régulation de différents phénomènes adaptatifs, est essentiel en présence de glucose et est également supposé être impliqué dans la régulation d'une transition métabolique glycolyse vers gluconéogenèse. Toutefois, bien que constaté, le caractère essentiel de CSR est à ce jour inexploré, tout comme son implication dans la régulation d'une adaptation métabolique. Autrement dit, le rôle du système CSR dans la régulation du métabolisme est actuellement l'objet de nombreuses suppositions et interrogations qu'il reste à résoudre.

Dans cette thèse, une approche de biologie intégrative a permis d'avancer pour la première fois, une explication de l'essentialité de CSR lors d'une croissance exponentielle sur glucose. La production, l'intégration par des approches de modélisation mathématique et la comparaison de données moléculaires et phénotypiques acquises pour une souche sauvage et une souche partiellement mutée pour la protéine CsrA ont mis en évidence la régulation CSR-dépendante du haut de la glycolyse. L'absence d'une régulation correcte de l'enzyme phosphofructokinase A par CSR engendre l'accumulation de métabolites intracellulaires aboutissant à un stress aux hexoses phosphate et à l'inhibition de la croissance.

Une étude focalisée sur l'implication du système CSR dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme carboné central lors d'une transition glucose-acétate, transition modèle d'une adaptation métabolique glycolyse vers gluconéogenèse, a permis de statuer sur l'implication du système CSR dans la régulation de cette transition métabolique. Grâce à l'utilisation de différents mutants du système CSR, nous avons pu mettre en évidence le rôle réel mais indirect de ce système lors de cette transition. Cette régulation s'effectue par la régulation de la synthèse de glycogène intracellulaire durant la phase glycolytique. Une fois le glucose consommé, le glycogène permet de maintenir un niveau énergétique élevé favorisant l'adaptation au nouveau substrat.

Finalement, des approches de transcriptomique et de stabilomique utilisées pour une souche sauvage au cours d'une adaptation métabolique ont mis en évidence l'importance des régulations de la stabilité des ARNm au cours de l'adaptation. Elles concerneraient notamment des facteurs de transcriptions associés à la réponse adaptative. Un très faible nombre des régulations de la stabilité serait potentiellement sous contrôle du système CSR.

En conclusion, ces travaux approfondissent grandement les connaissances concernant le système CSR et son implication dans la régulation du métabolisme d'*E. coli*. Ce système, indispensable à la régulation du métabolisme durant une phase de croissance sur glucose s'ajoute de façon indéniable au réseau déjà complexe de régulations du métabolisme d'*E. coli*.

Function of the post-transcriptional regulator CSR during the metabolic adaptation of the model bacteria *Escherichia coli*

In its natural environment, *Escherichia coli* (*E. coli*) faces strong fluctuations of the nutrient availability. A complex gene regulatory network makes the bacterium able to switch between a state of growth in the presence of an appropriate carbon source and a non-growth state in its absence. Within this network, the global post-transcriptional regulator CSR (Carbon Storage Regulator) modifies mRNA stability and/or translation initiation by the CsrA protein. This system is involved in the regulation of different adaptive phenomena. It has also been shown to be essential for cells to grow on glucose and is hypothesized to be involved in the regulation of metabolic transitions. However both observations remained unexplored so far. The role of CSR in the regulation of the metabolism is thus still subject to many hypotheses that await further demonstration.

An integrative approach has been used during this work to investigate for the first time the essentiality of CSR on glucose. Molecular and phenotypic data for two strains (the wild-type K12 MG1655 and a strain deleted for the 10 last amino acids of the CsrA protein) have been produced and integrated into mathematical models. The results show a CSR-dependent regulation in the upper part of glycolysis. Mis-regulation in the absence of CSR activity leads to the accumulation of glycolytic metabolites and a hexose phosphate stress triggering growth inhibition.

Another study evaluated the regulatory role of CSR in the expression of central carbon metabolic genes during the glucose-acetate metabolic transition. This transition is an adaptation from a glycolytic metabolism to a gluconeogenic one. The study validates the hypothesis of CSR involvement during such metabolic adaptation. However, the role of CSR appears to be indirect, by regulating the accumulation of intracellular glycogen during the glucose consumption phase. In fact, the accumulated glycogen favors the cell adaptation to acetate by preventing the energetic drop following glucose exhaustion.

Transcriptomic and Stabilomic approaches have been used eventually to characterize the importance of the control of mRNA stability during the metabolic adaptation. mRNA stability regulations appear to be of particular importance in gene expression regulation during metabolic adaptation and mainly concern stabilization of mRNAs of transcriptional factors involved in the adaptive response. Few of the stability regulations are likely to be CSR-related.

To conclude, this work shed a new light upon CSR's involvement in the regulation of *E. coli*'s metabolism. CSR is definitely essential to regulate glycolysis and thus constitutes another regulator to be integrated into the already complex regulations network of *E. coli*'s metabolism.

Remerciements

Une thèse, c'est un engagement et un accomplissement personnel certes, mais impossible à réaliser sans la présence de nombreuses personnes que je tiens maintenant à remercier.

Tout d'abord, je remercie les Dr. Eliane Hajnsdorf, Mickael Desvaux et Jean-Pierre Mazat d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèses, malgré des emplois du temps chargés.

Je tiens à remercier également Nic Lindley, directeur du LISBP, pour sa présence en tant que président du jury lors de ma soutenance et également pour ses conseils et sa bienveillance au cours de nos quelques discussions ces trois dernières années.

Un grand merci à mes encadrants : Muriel Cocaign-Bousquet, Delphine Ropers et Brice Enjalbert qui m'ont formée, soutenue et accompagnée durant ces trois années. Leur encadrement m'a permis de gagner en confiance et en maturité scientifique. Muriel, je te remercie tout particulièrement pour ta bonne humeur quotidienne et ton optimisme. J'ai remarqué que tous tes thésards t'ont remerciée pour ces mêmes qualités et ils ont eu raison. Je te remercie également pour ta patience et ta disponibilité, surtout ces derniers mois ! Delphine, merci beaucoup pour ton enthousiasme, ta disponibilité et ta capacité à expliquer si simplement la modélisation. Malgré les kilomètres entre Grenoble et Toulouse, tu as toujours su répondre à mes interrogations. Enfin Brice, merci pour ton implication et ton aide continues au cours de ces trois années à la paillasse comme à l'interprétation des résultats et à la rédaction des papiers. Ton honnêteté et tes remarques parfois un peu brusques m'ont poussée à prendre confiance en moi et pour cela je t'en remercie.

Durant ces travaux, j'ai été amenée à travailler avec plusieurs équipes du LISBP et de l'INRIA Grenoble-Rhône-Alpes dont l'aide et les conseils ont toujours été d'une grande utilité. C'est pourquoi j'adresse toute ma gratitude à l'équipe Ibis de l'INRIA de Grenoble Rhône-Alpes qui m'a accueillie quelques temps lors d'un petit séjour modélisation dans leurs bureaux. Je remercie également la plateforme Get-Genotoul et tout particulièrement Lidwine pour les analyses de transcriptome et stabilome, sa souplesse quant aux critères qualité des ARN et nos discussions voyages et aventure. Je tiens à remercier chaleureusement l'équipe EAD6, qui, finalement, est un peu ma deuxième équipe au LISBP. Un grand merci à Jean-Charles Portais

de m'avoir accueillie dans les labos de son équipe pour mes premières fermentations. Merci également à Fabien Létisse pour ses nombreux conseils et nos nombreuses discussions scientifiques très intéressantes. Merci à Lindsay et Lara pour leur gentillesse et leur aide en RMN et spectrométrie de masse. Merci à Pierre pour ses conseils et ses remarques scientifiques tellement utiles, sa disponibilité et son aide pour les démarches de post-doc. Enfin, merci à Florian, Stéphanie, Edern, Maria, Anna et Cécilia qui ont tous, à un moment donné, pu m'aider et contribué à la production de ces travaux. Merci à la plateforme Metasys pour les analyses RMN et de spectrométrie de masse.

En trois ans, lors de pause-café ou dans le bureau, j'ai eu l'occasion de rencontrer et de discuter avec de nombreuses personnes. Je pense notamment à Luce, collègue de bureau aux conseils avisés, Cléa et Marine, jeunes padawan et professionnelles en personnalisation d'espace de travail, Charles, co-utilisateur de fermenteurs et bien d'autres, à qui j'adresse un grand merci pour m'avoir accordé à un moment ou un autre un peu de leur temps.

Ces trois dernières années, j'ai eu la chance de vivre mon quotidien au cœur d'une fabuleuse équipe, l'EAD4 dont je tiens à remercier tous les membres, permanents et «non permanents». Vous avez su composer une équipe accueillante, chaleureuse et dans laquelle j'ai eu le plaisir de pouvoir évoluer. En plus des interactions scientifiques, ce sont tous les moments «non scientifiques» comme les barbecues d'équipe, les petit-déj du vendredi, les repas de Noël ou simplement tous les déjeuners ensemble qui ont rendu cette équipe soudée et agréable à vivre. Avant de remercier chaque personne une par une (à noter qu'il n'y a pas d'ordre de préférence ou d'importance !), merci à tous de m'avoir supportée ces trois années. Laurence, merci pour ton calme, ton aide précieuse sur les analyses stabilome et transcriptome et ta gentillesse. Sophie, merci pour les extractions d'ARNm, tu es l'experte en la matière et merci tous les nombreux coups de pouces que tu as pu me donner durant ces trois ans. Marie-Pierre, merci pour ta bonne humeur habituelle et ton oreille attentive. Valérie, merci pour les conseils HPLC et fermentation. Seb, merci pour tes conseils biomol. Marie-Line, merci pour les chocolats. Pascal, merci pour les ti-punchs du barbecue d'équipe. Sandrine, merci pour les analyses statistiques ou notre apprentissage commun de la FVA. Mickael, (même si EAD7 maintenant mais en fait au fond, on s'en fiche un peu) merci pour les discussions canines et nature du midi avec Marie-Pierre. Place aux plus jeunes maintenant. Un très grand merci aux trois stagiaires qui ont participé à la production de ces travaux de thèse : Alessandra, Andréa et Aurélien. Je tiens également à remercier Cécile, autre euroise expatriée

comme moi à Toulouse, Arthur SL, futur doctorant EAD11 qui réussira j'en suis sûre, Benjamin, assistant ingénieur un peu fou certes, mais tellement gentil et courageux, Pauline (ou Popo) ingénieure de mérite, Stéphanie et Amandine, deux thésardes en fin de thèse lorsque je ne faisais que commencer la mienne. Pour finir, une pensée et une dédicace toute particulière à des personnes devenues bien plus que de collègues. Arthur R, bon courage pour tes nouveaux projets, je te souhaite une très belle réussite dont je ne doute pas. Thomas E, futur papa médecin (et oui tu seras papa avant d'être un vrai docteur) et aussi un des premiers thésards CSR avec Pierre, je te remercie pour ton aide durant mes travaux et te souhaite tout le bonheur du monde dans ta nouvelle vie de famille. Rozenn, ma bretonne préférée, je te souhaite plein de belles choses, de belles découvertes et de beaux voyages maintenant que tu es installée à Caen. Reste comme tu es, déterminée, intelligente et surtout, montrent leur à Caen, qu'entre la Bretagne et la Normandie une amitié est possible ! Anne-Laure (et toute ta petite famille), merci d'avoir toujours été disponible pour discuter, sciences ou pas sciences, important ou superficiel. On ne t'appelle pas maman pour rien. Merci pour ces nombreuses soirées jeu et pizza ! Et enfin, Marie, qui pour le coup, j'ai volontairement gardée pour la fin, merci beaucoup pour ces trois années que nous avons commencées en même temps, et que nous avons finies en même temps ! Je n'aurais pas pu rêver mieux en termes de « copine de thèse ». Nos discussions, notre entre-aide et nos rigolades ont été pour moi un réel bonheur et un réel moteur. Je te souhaite d'être heureuse et épanouie pour la suite. Gab et toi vous êtes bien trouvés, bonne chance à tous les deux !

Il me tient à cœur d'intégrer dans ces remerciements mes amis et mes proches qui ont été là pour moi, depuis de longues années et qui ont su m'accompagner et me soutenir dans cette période qui leur a paru peut-être un peu extrême. Merci à toi Mathilde, depuis ces nombreuses années et malgré la distance d'avoir toujours été là, enthousiaste et rassurante. Merci à vous, Max, Leslie, Damien et Anaïs, d'être restés proches de Fred et moi et de nous avoir soutenus. Je tiens à remercier chaleureusement Nicole et Max, mes beaux-parents, qui ont su m'accepter à bras ouverts et m'ont toujours proposé leur aide. Merci de votre générosité. Un merci infiniment grand à mes parents et à ma sœur Marie. Leur amour et leur soutien, leur écoute et leur patience, m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. Ils m'ont fait confiance et ont cru en moi. Je vous aime. Petit Lou, tu as bien de la chance d'avoir des parents comme Marie et Jonathan (que je remercie également de faire partie de notre famille).

Et enfin, pour être là, encore et toujours, merci à toi, Fred. Je t'aime, tout simplement.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
I. La bactérie <i>Escherichia coli</i>	9
I.A. Présentation générale	9
I.B. Besoins nutritionnels et croissances.....	10
I.C. Capacité d'adaptation à l'environnement	11
II. Les différents niveaux de régulation de l'expression génétique	13
II.A. Régulation transcriptionnelle	13
II.A.1. Régulation globale.....	15
II.A.2. Régulations spécifiques.....	15
II.B. Régulation post-transcriptionnelle	17
II.B.1. Régulation de la stabilité des ARNm	17
II.B.2. Régulation de la traduction	24
II.C. Régulation post-traductionnelle.....	25
II.C.1. Régulation de la stabilité des protéines	26
II.C.2. Régulation de l'activité des protéines et des enzymes	27
III. Adaptabilité du métabolisme carboné central face à l'offre en carbone	29
III.A. Description et fonction du métabolisme carboné central (MCC).....	29
III.A.1. Définition du MCC.....	29
III.A.2. Fonction du MCC.....	31
III.B. Optimisation du MCC en présence de glucose	32
III.B.1. Assimilation du glucose et répression catabolique	33
III.B.2. Régulation des flux métaboliques par les « senseurs » de flux.....	36
III.B.3. Overflow métabolique et production d'acétate	38
III.C. Adaptation du MCC suite à la disparition du glucose	38
III.C.1. Diauxie.....	39
III.C.2. Entrée en phase stationnaire	40
IV. Le système de régulation post-transcriptionnel CSR	47
IV.A. Description du système de régulation CSR chez <i>Escherichia coli</i>	47
IV.A.1. La protéine essentielle CsrA.....	47
IV.A.2. Les ARN non codants CsrB et CsrC	49
IV.A.3. La protéine CsrD.....	50
IV.A.4. Le système à double composante BarA/UvrY.....	50
IV.B. Mécanismes de régulation par le système CSR chez <i>Escherichia coli</i>	52
IV.B.1. Mécanismes de régulation négative	52
IV.B.2. Mécanismes de régulation positive	53
IV.C. Les ARNm cibles du système CSR et phénomènes physiologiques régulés	55
IV.C.1. ARNm cibles de CsrA	55
IV.C.2. Fonctions cellulaires régulées par le système CSR.....	57
IV.D. Les régulations du système CSR	61
IV.D.1. Régulations de CsrA	62
IV.D.2. Régulation des ARNnc CsrB et CsrC	62
IV.D.3. Inter-régulations avec d'autres systèmes de régulations	63

V. Stratégie d'analyse de l'adaptation du MCC.....	65
V.A. Acquisition de sets de données expérimentales pour l'étude du métabolisme	66
V.A.1. Transcriptome et stabilome	66
V.A.2. Métabolome	67
V.B. Détermination <i>in silico</i> de flux métaboliques – Approches de Flux Balance Analysis	68
V.B.1. Principe	69
V.B.2. Extensions	72
V.C. Intégration des données et étude du MCC	74
V.C.2. Modélisation mécanistique	75
V.C.3. Analyse de régulation hiérarchique (HRA)	75
VI. Objectifs de thèse	79
CHAPITRE 1	
Regulation du metabolisme glycolytique par le regulateur post-transcriptionnel CSR	83
CHAPITRE 2	
Le systeme csr regule indirectement la transition metabolique glucose-acetate en regulant l'accumulation du glycogene durant la phase de croissance sur glucose.....	127
CHAPITRE 3	
Role de la stabilite des arnm dans la regulation de l'expression genique au cours de l'adaptation metabolique chez <i>E. coli</i>.....	159
CHAPITRE 4	
Role du systeme csr dans la regulation de l'expression genique lors de la phase de croissance exponentielle sur glucose.....	215
CONCLUSION & PERSPECTIVES	225
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	239
PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS	267

Abréviations

Micro-organismes :

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Métabolites:

Abréviation	Français	English
1,3-biP-glycérate	1,3-biphospho glycérate	1,3-biphospho glycerate
2céto-3-désoxy-gluconate-6-P	2-céto-3désoxy-gluconate 6-phosphate	2-ceto-3deoxy-gluconate 6-phosphate
2-P-glycérate	2-phospho glycérate	2-phospho-glycerate
3-P-Glycérate/3PG	3-phospho glycérate	3-phospho-glycerate
6PG	6-phosphogluconate	6-phosphogluconate
ACE	Acétate	Acetate
Acétyl-CoA / ACA	Acétyl-coenzyme A	Acetyl-coenzyme A
ADP	Adénosine diphosphate	Adenosine diphosphate
ADP-Glc	ADP-Glucose	ADP-Glucose
AMP	Adénosine monophosphate	Adenosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate	Adenosine triphosphate
CDP	Cytidine diphosphate	Cytidine diphosphate
CMP	Cytidine monophosphate	Cytidine monophosphate
CTP	Cytidine triphosphate	Cytidine triphosphate
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate	Dihydroxyacetone-phosphate
E4P	Erythrose 4-phosphate	Erythrose-4-phosphate
Fructose 1,6-biP/FBP	Fructose 1,6 diphosphate	Fructose 1,6 diphosphate
Fructose 6-P/F6P	Fructose 6-phosphate	Fructosee6-phosphate
G1P	Glucose 1-phosphate	Glucose-1-phosphate
GDP	Guanosine diphosphate	Guanosine diphosphate
GLC	Glucose	Glucose
Glucose 6-P/G6P	Glucose 6-phosphate	Glucose 6-phosphate
Glucose-1-P/ G1P	Glucose 1-phosphate	Glucose 1-phosphate
Glycéraldéhyde 3-P/GAP	Glycéraldéhyde 3-phosphate	Glyceraldehyde-3-phosphate
GMP	Guanosine monophosphate	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate	Guanosine triphosphate
P-enolpyruvate/PEP	Phosphoénolpyruvate	Phosphoenolpyruvate
PYR	Pyruvate	Pyruvate
R5P	Ribose 5-phosphate	Ribosee5-phosphate
Ribulose-5-P	Ribulose 5-phosphate	Ribulosee5-phosphate
Sedoheptulose-7-P/S7P	Sedoheptulose 7-phosphate	Sedoheptulosee7-phosphate
Succinyl-CoA/ SCA	Succinyl-coenzyme A	Succinyl-coenzyme A
UDP	Uridine diphosphate	Uridine diphosphate
UMP	Uridine monophosphate	Uridine monophosphate
UTP	Uridine triphosphate	Uridine triphosphate
Xylulose-5-P	Xylulose 5-phosphate	Xylulose 5-phosphate

INTRODUCTION

La bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*) est une bactérie à Gram-négative hétérotrophe utilisée depuis de nombreuses années comme organisme modèle en microbiologie. Cette bactérie est également une des espèces commensales retrouvées au sein de la flore intestinale aérobie. Dans cet environnement, *E. coli* est soumise à d'importantes fluctuations en nutriments. En conséquence, elle est capable de se développer sur différents substrats carbonés et d'alterner entre des phases de croissance et de colonisation et des phases de maintenance. Ceci témoigne d'une grande capacité d'adaptation métabolique soutenue par un réseau complexe de régulations de l'expression génique. L'expression des gènes est régulée aux niveaux transcriptionnel (régulation de la transcription), post-transcriptionnel (régulation de la stabilité des ARNm et de la traduction) et post-translationnel (régulation de la concentration et de l'activité des protéines). La compréhension et l'intégration des mécanismes sous-jacents à chacune de ces régulations représentent actuellement un enjeu majeur dans la prédiction des capacités d'adaptation de la bactérie à son environnement.

L'utilisation de données -omiques couplée à l'utilisation de modèles mathématiques et statistiques permet d'appréhender le métabolisme bactérien dans sa globalité par une approche de biologie des systèmes. Le développement ces 15 dernières années des techniques dites « -omiques » a permis d'acquérir, à l'échelle des génomes, des données associées à l'ensemble des régulations de l'expression des gènes. Parmi elles, on compte entre autre la concentration des ARNm d'une cellule (transcriptome), leur temps de demi-vie (stabilome), la concentration des protéines intracellulaires (protéome) ou encore celles des métabolites (métabolome).

Les approches de transcriptomique et de stabilomique permettent notamment d'analyser les régulations post-transcriptionnelles associées à la variation de la stabilité des ARNm. Alors que quelques études menées chez les lactocoques (bactéries à Gram-positives) soulignent l'implication des régulations post-transcriptionnelles dans l'adaptation de ces bactéries face à la disponibilité en substrat (Dressaire *et al.*, 2013; Redon *et al.*, 2005), aucun travail concernant leur implication globale au cours de l'adaptation métabolique chez *E. coli* n'a été mené. Il en est de même quant à leur intégration dans la compréhension du métabolisme de cette bactérie. Plus particulièrement, le régulateur post-transcriptionnel CSR (Carbon Storage Regulator) est impliqué chez *E. coli*, d'une part dans la régulation du

métabolisme et d'autre part dans la régulation de phénomènes adaptatifs tels que la virulence, la mobilité ou le stockage des sucres de réserve. Cependant son implication dans la régulation d'une adaptation métabolique, bien que supposée, n'a encore jamais été démontrée.

Cette thèse s'appuie sur une démarche de biologie des systèmes afin de caractériser le rôle des régulations post-transcriptionnelles et plus particulièrement celui du système CSR dans la régulation de l'adaptation métabolique chez *E. coli*. Pour cela, nos travaux se portent sur l'étude de la transition métabolique glucose-acétate, modèle d'étude utilisé au LISBP et représentatif des transitions entre phase de croissance et phase de maintenance observées dans l'environnement intestinal par *E. coli*. L'acquisition de différentes données moléculaires à l'échelle du génome et leur intégration par des approches mathématiques et statistiques tout comme l'utilisation de différents mutants du système CSR a mis en lumière l'implication du système CSR dans la régulation de l'adaptation métabolique d'*E. coli* et ouvre de nouvelles perspectives quant à l'importance globale des régulations post-transcriptionnelles jusqu'ici peu considérées.

Cette thèse se divise en trois parties. Tout d'abord, une étude bibliographique présente les informations nécessaires à la contextualisation et à la compréhension de ces travaux. Ainsi, après une brève présentation de la bactérie *E. coli*, sont présentés les différents niveaux de l'expression génique, l'adaptabilité du métabolisme carboné central d'*E. coli* face à la disponibilité en substrat, le système CSR et finalement les différents outils d'étude du métabolisme carboné central. Les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse sont présentés en trois chapitres rédigés en anglais sous la forme d'articles scientifiques précédés d'un résumé en français. Un quatrième chapitre présente la nature de travaux en cours de production, concernant la caractérisation des transcriptomes et stabilomes de mutants de CSR sur glucose mais dont les données n'ont été obtenues que très récemment. Finalement, ce manuscrit se termine par une conclusion générale permettant, à partir de l'ensemble des résultats, de donner une caractérisation complète du rôle du système CSR au niveau de la

régulation de l'adaptation métabolique d'*E. coli*. Les perspectives scientifiques émergentes de ces travaux de thèse y sont également présentées.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. La bactérie *Escherichia coli*

I.A. Présentation générale

La bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli* (*E. coli*) est un bacille, anaérobie facultatif. Elle a été isolée pour la première fois en 1885 par Theodor Escherich. Elle est définie selon la classification suivante : *Bacteria* – *Proteobacteria* – *Gammaproteobacteria* – *Enterobacteriales* – *Enterobacteriaceae* – *Escherichia* – *Escherichia coli*. Certaines souches sont des souches commensales retrouvées dans le microbiote (Eckburg *et al.*, 2005; Tenailon *et al.*, 2010) d'autres sont des souches pathogènes à l'origine de différentes pathologies intra ou extra-intestinales (Croxen and Finlay, 2010; Kaper *et al.*, 2004). Une analyse phylogénétique effectuée sur les différentes souches d'*E. coli* isolées de l'Homme a déterminé quatre groupes principaux (A, B1, B2 et D1) et deux groupes secondaires (D2 et E) (Figure 1).

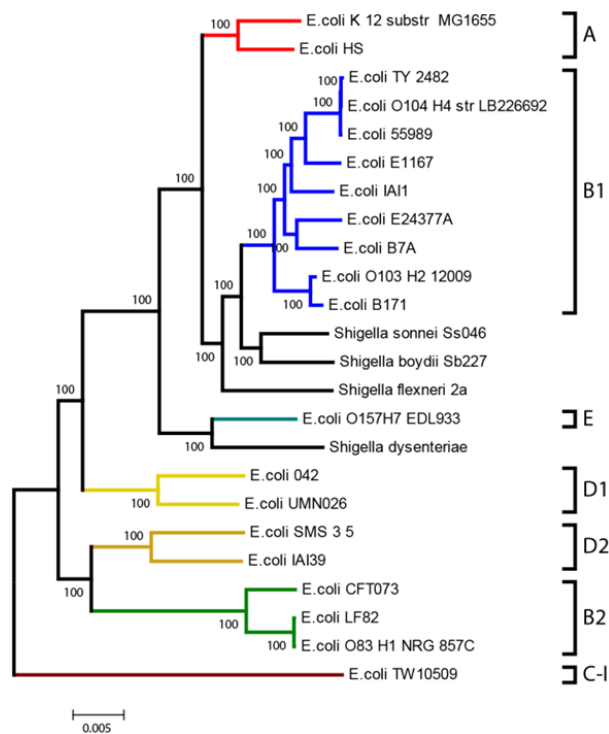


Figure 1 : Phylogénies des différentes souches d'*Escherichia coli* déterminée à partir des génomes disponibles des souches d'*E. coli* présentes dans le microbiote humain (Chaudhuri and Henderson, 2012). Les groupes A et B1 regroupent les souches commensales et quelques souches pathogènes intra intestinales. Les groupes B2 et D1 contiennent majoritairement des souches pathogènes extra intestinales.

La souche *Escherichia coli* K12 MG1655, souche d'étude de ces travaux, est une souche non pathogène dérivée de la souche ancestrale K12. Cette dernière, isolée en 1922, a subi

plusieurs modifications (perte de l'antigène O, du bactériophage λ et du plasmide F) pour donner la souche MG1655 (Bachmann, 1996). Cette souche a été la première souche d'*Escherichia coli* séquencée (Blattner *et al.*, 1997) : la taille de son génome est de 4.64 Mb. Son génome contient environ 4500 gènes (dont 4300 codent des protéines) et environ 300 d'entre eux sont essentiels (Baba *et al.*, 2006).

L'utilisation d'*Escherichia coli* en recherche fondamentale tout comme dans les biotechnologies se justifie par la présence de nombreuses caractéristiques favorables. En effet, la souche K12 MG1655 est non pathogène et a fait l'objet de peu de modifications génétiques. Elle présente des capacités de croissance rapides avec un taux de croissance maximum pouvant aller jusqu'à 1.68 h^{-1} (Baev *et al.*, 2006), et ce dans des conditions simples et maîtrisables : croissance optimale à 37°C , pH7 et aérobie facultative.

Les premiers pas de l'ingénierie métabolique et de la biologie de synthèse ont été effectués chez cette bactérie. L'une des premières avancées ayant été la synthèse de l'insuline recombinante chez une souche d'*E. coli* K12 fin des années 70 (Goeddel *et al.*, 1979). Aujourd'hui encore elle sert de modèle dans la compréhension de mécanismes fondamentaux complexes.

I.B. Besoins nutritionnels et croissances

Pour sa croissance, la souche K12 MG1655 requiert : une source organique de carbone (hétérotrophie), une source d'azote, du soufre, du phosphore ainsi qu'un apport en différents cations minéraux (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}). La source de carbone constitue également la source d'énergie indispensable à la croissance. La souche K12 MG1655 accepte une grande variété de substrats carbonés différents comme des glucides, des acides aminés ou encore des acides faibles (Yoon *et al.*, 2012).

La souche *E. coli* K12 MG1655 peut être cultivée sur milieux riches ou sur milieux minimums supplémentés d'une source de carbone et de thiamine, en fonction de son contexte d'utilisation. Les milieux riches tels que le milieu « Lysogenic Broth » (LB) (Bertani 2004) sont des milieux complexes qui permettent une croissance rapide. Ils sont largement utilisés pour des applications industrielles. En plus de procurer aux cellules tous les éléments

essentiels, ces milieux contiennent certains intermédiaires biosynthétiques et des facteurs de croissance comme des vitamines (Miller and Churchill, 1986). Contrairement à ces milieux complexes, les milieux minimums ont une composition définie qui ne comprend que les éléments strictement indispensables à la croissance. De tels milieux possèdent obligatoirement une source carbonée (source de carbone et d'énergie), de la thiamine, une source de potassium, de phosphore, d'azote, de soufre, de magnésium, de calcium et de fer. Même si ces milieux ne supportent pas des croissances aussi rapides (taux de croissance maximum de $0.6h^{-1}$ en présence de glucose (Volkmer and Heinemann, 2011)), ils sont idéals pour des études physiologiques car la physiologie de la cellule est alors majoritairement dirigée par la source de carbone utilisée.

I.C. Capacité d'adaptation à l'environnement

Dans leur environnement, les bactéries *E. coli* subissent de fortes pressions et d'importants changements auxquels elles doivent faire face pour subsister. Les bactéries font preuve d'une importante capacité d'adaptation afin d'optimiser leur chance de survie et de prolifération dans un contexte donné. Les bactéries disposent de nombreuses stratégies afin de surmonter différents stress auxquels elles peuvent être confrontées durant leur développement.

Elles sont capables de réparer des dommages provoqués par des facteurs environnementaux : en produisant par exemple des protéines chaperonnes qui réparent les protéines endommagées par un choc de température (Dougan *et al.*, 2002) ou encore en réparant leur ADN endommagé par certains facteurs comme les UV, des agents antimicrobiens ou une pression osmotique trop importante (D'Ari, 1985; Kuzminov, 1999). Les bactéries alternent également entre un mode de vie mobile et un mode de vie fixe en fonction des conditions environnementales. Ainsi, elles développent un caractère chimiotactique face à certains composés toxiques ou envers des nutriments (Adler, 1976). Au contraire les cellules forment parfois des biofilms en adhérant entre elles et à une surface (Moons *et al.*, 2009). Cette structure particulière leur confère une résistance face aux agressions extérieures.

La survie des bactéries passe également par une capacité à s'adapter rapidement à l'offre en nutriments qui peut varier brusquement en ajustant leur métabolisme. Les différentes stratégies d'adaptation métabolique seront l'objet de la troisième partie de cette partie bibliographique.

Dans tous les cas, la stratégie d'adaptation mise en place par les bactéries repose sur l'utilisation de mécanismes de régulation de l'expression génique qui visent à optimiser l'expression et l'activité de protéines particulières.

II. Les différents niveaux de régulation de l'expression génétique

L'expression génique comprend toutes les étapes qui permettent d'obtenir une protéine active à partir d'un gène donné. Elle inclut l'étape de transcription, synthèse d'un ARN messenger (ARNm) associé à un gène donné, et l'étape de traduction, synthèse de la protéine associée à l'ARNm. Chaque étape de l'expression génique est soumise à différentes régulations (Figure 2). La bonne coordination de ces régulations permet d'exprimer correctement et au bon moment les différents gènes de la cellule.

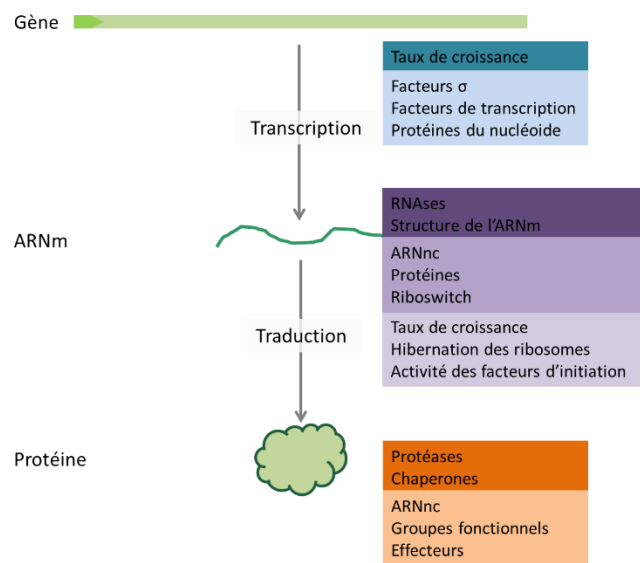


Figure 2 : Régulateurs des différents niveaux de l'expression génique. Bleu : régulateurs transcriptionnels (foncé : régulation globale, clair : régulation spécifique), Violet : régulateurs post-transcriptionnels (foncé : régulateurs de la stabilité des ARNm, clair : régulateurs de la traduction, intermédiaire : régulateurs de la stabilité des ARNm et de la traduction), Orange : régulateurs post-traductionnels (foncé : Régulateurs de la stabilité des protéines, clair : régulateurs de l'activité des protéines). D'après (Timmermans et Van Melderen, 2010)

II.A. Régulation transcriptionnelle

La première étape de l'expression d'un gène correspond à la transcription, c'est-à-dire à la synthèse d'un brin d'ARNm à partir d'une séquence codante d'ADN grâce à l'enzyme ARN polymérase (ARNpol). Cette holoenzyme est constituée de quatre sous-unités catalytiques (deux sous-unités α , une sous-unité β et une sous-unité β') formant le core de l'holoenzyme (Darst *et al.*, 1989; Ishihama, 1981, 2000), et d'un facteur σ permettant la reconnaissance des promoteurs au niveau de deux séquences fortement conservées en positions -35 et -10 du gène (Burgess *et al.*, 1969; Ghosh *et al.*, 2010; Vassylyev *et al.*, 2002) (Figure 3.A).

La transcription se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Ghosh *et al.*, 2010) (Figure 3.B). Lors de l'étape d'initiation, l'ARNpol se fixe au niveau de la région promotrice du gène. S'ensuit une ouverture de l'ADN entre les régions -10 et +1 du gène (Figure 3.B). L'élongation se produit alors dans le sens 5'-3' par l'ajout de nucléotides triphosphates complémentaires au brin d'ADN codant. Après l'ajout d'une dizaine de nucléotides, le facteur σ se détache de l'holoenzyme et seul le core enzymatique continue la transcription jusqu'au site de terminaison (Shimamoto *et al.*, 1986). La terminaison peut se faire de deux façons : spontanée ou dépendante d'un facteur Rho. La présence d'une séquence palindromique suivie d'une séquence riche en adénosine est à l'origine de la terminaison spontanée. En effet, cette séquence engendre la formation d'une structure tige boucle stable suivie de plusieurs uraciles qui sont alors appariés à l'adénosine de l'ADN. Cet appariement étant peu stable, l'ARNm se décroche de l'ADN qui se referme ensuite (Figure 3.C). Le facteur Rho peut aussi être nécessaire à la terminaison. Cette protéine se fixe à l'ARN en formation et le parcourt jusqu'à son extrémité 3' au niveau de l'ARNpol, ce qui aboutit au décrochage de l'ARNm puis à la fermeture de l'ADN (Nudler and Gottesman, 2002).

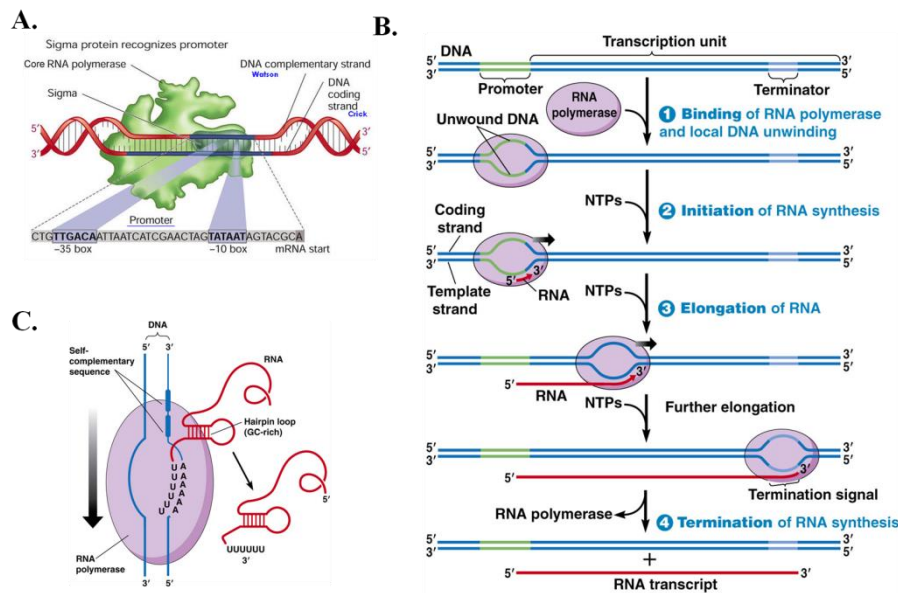


Figure 3 : La transcription chez les procaryotes. A. Reconnaissance de la région promotrice par le facteur σ . B. Etapes de la transcription. C. Terminaison spontanée de la transcription.
 (Sources : <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html>. [Principles of Cell Biology \(BIOL2060\)](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CBhome.html) Department of Biology - Memorial University of Newfoundland)

La transcription peut être modulée à chacune de ces étapes. Cependant, la majorité de la régulation est effectuée au niveau de l'initiation. La régulation de la transcription résulte de l'effet combiné d'une régulation globale dépendante de l'état physiologique de la cellule et d'une régulation spécifique dépendante de facteurs cellulaires (Berthoumieux *et al.*, 2013; Bremer and Dennis, 1996; Klumpp *et al.*, 2009).

II.A.1. Régulation globale

En 1958, Schaechter et ses coéquipiers ont montré que la physiologie de la cellule et sa composition macromoléculaire dépendent de son activité métabolique. Autrement dit, les quantités d'ADN, d'ARN ou encore de protéines comme l'ARNpol dépendent des conditions de croissance (Schaechter *et al.*, 1958) et du taux de croissance. Ainsi, l'expression génique et la transcription dépendent également des conditions et du taux de croissance. En effet, les gènes dits « constitutifs » (*i.e.*, dont l'activité du promoteur n'est pas régulée) subissent cet effet du taux croissance : plus le taux de croissance est important, plus ils sont transcrits (Liang *et al.*, 1999).

L'augmentation du taux de croissance entraîne l'augmentation de la transcription suite à différents phénomènes : (i) l'augmentation du nombre et de l'activité des ARNpol présentes dans la cellule (Bremer and Dennis, 1996; Ehrenberg *et al.*, 2013), (ii) l'augmentation du pourcentage d'ARNpol libres et fonctionnelles avec le taux de croissance (Bremer *et al.*, 2003; Klumpp and Hwa, 2008) et (iii) l'augmentation du nombre de fourches de réplifications au niveau de l'ADN bactérien (Bremer et Dennis, 1996) ce qui a pour effet d'accentuer la transcription des gènes situés à proximité comme les gènes ribosomiaux (Jin *et al.*, 2012).

II.A.2. Régulations spécifiques

La régulation transcriptionnelle ne dépend pas seulement de l'état physiologique de la cellule mais aussi de signaux environnementaux. Ces régulations spécifiques sont produites de différentes façons : par le facteur σ associé à l'ARNpol (Wösten, 1998), par des facteurs de transcription ou par des protéines associées au nucléoïde (région contenant le matériel génétique de la cellule procaryote).

Chez *E. coli*, il existe sept facteurs σ (σ^{70} (*rpoD*), σ^s (*rpoS*), σ^{32} (*rpoH*), σ^f (*fliA*), σ^E (*rpoE*) et σ^{18} (*fecI*)), chacun reconnaissant des régions promotrices différentes (Gruber and Gross, 2003; Paget, 2014). Le facteur σ^{70} est associé à la transcription de tous les gènes essentiels à la cellule durant la croissance (Gross *et al.*, 1998). Ce facteur σ est toujours présent majoritairement dans la cellule, quelles que soient les conditions. Les six autres facteurs σ sont synthétisés suite à des stimuli environnementaux et régulent l'expression de gènes impliqués dans la réponse à ces stress (Visca *et al.*, 2002). σ^s (*RpoS*) est largement impliqué dans la transcription des gènes de phase de carence et de phase stationnaire définie comme une phase durant laquelle la taille de la population ne varie pas et les cellules survivent dans leur environnement (Gaal *et al.*, 2001; Hengge-Aronis, 2002), même si son implication dans la transcription de 268 gènes durant une phase de croissance a été démontrée (Dong *et al.*, 2008). La synthèse et l'activité de ces facteurs σ font l'objet de nombreuses régulations (Ishihama, 2000). Par exemple, la transcription du facteur σ^{18} est activée lors d'une carence en fer, suite à la levée de l'inhibition exercée par la protéine Fur sur le gène *fecI* lors d'un excès de fer dans l'environnement (Enz *et al.*, 1995). L'activité des facteurs σ peut être inhibée par un facteur anti-sigma spécifique (Österberg *et al.*, 2011; Treviño-Quintanilla *et al.*, 2013). La dégradation du facteur anti- σ^E suite à une détérioration des protéines de la membrane permet de libérer le facteur σ^E et de restaurer son activité (Ades *et al.*, 1999).

Un deuxième mécanisme impliqué dans la régulation spécifique de la transcription est l'intervention de facteurs de transcription. Ces protéines capables de se fixer à l'ADN, activent ou répriment l'initiation de la transcription par divers mécanismes (Zhou and Yang, 2006). Chez les souches *E. coli* K12, 314 facteurs de transcription ont été répertoriés (Pérez-Rueda and Collado-Vides, 2000). Parmi eux : 110 sont des activateurs et 135 sont des répresseurs. Les 69 autres ont une activité mixte, en fonction des gènes qu'ils régulent. Des facteurs de transcription, appelés régulateurs globaux, régulent l'expression de plus d'une centaine de gènes. Il en existe sept chez *E. coli* : ArcA, Crp, Fis, Fnr, Ihf, Lrp et NarL (Martínez-Antonio and Collado-Vides, 2003). Ces sept facteurs de transcription régulent à eux seuls l'expression de 50% du génome bactérien. 60 facteurs de transcription régulent l'expression d'un seul gène. L'activité des différents facteurs de transcription est soumise à une importante régulation en fonction des conditions intra et/ou extracellulaires (Martínez-Antonio, 2011). De petits ligands

peuvent s'associer aux facteurs de transcription et modifier leur affinité pour les domaines de l'ADN. L'un des exemples le plus connu est l'activation du facteur global Crp par la petite molécule AMPc (Błaszczuk *et al.*, 2001; Zubay *et al.*, 1970). Au contraire, des molécules comme le fructose 1,6-biphosphate ou fructose 1-phosphate interagissent avec le facteur de transcription Cra et empêche sa fixation à l'ADN (Saier and Ramseier, 1996). D'autres facteurs de transcription sont soumis à des modifications covalentes qui modifient leur fonctionnalité. C'est le cas des systèmes à double composantes, où suite à un stimulus environnemental, une kinase phosphoryle un facteur de transcription et régule son activité (Hoch, 2000).

Parmi ces facteurs de transcription, certains sont des protéines appelées protéines associées au nucléoïde (ou NAP). Ces protéines, dont les plus connues chez *E. coli* sont H-NS, IHF ou Fis, s'associent à la molécule d'ADN circulaire de la cellule (Azam and Ishihama, 1999). Cette association est probablement responsable de la structuration de l'ADN même si les mécanismes restent encore inconnus (Dame, 2005; Drlica and Rouviere-Yaniv, 1987). Les NAP peuvent inhiber ou activer la transcription de certaines régions de l'ADN en fonction de leur positionnement (Dillon and Dorman, 2010; McLeod and Johnson, 2001; Pruss and Drlica, 1989).

II.B. Régulation post-transcriptionnelle

L'ARNm formé à l'issue de la transcription sert de matrice à la synthèse de la protéine par les ribosomes. L'ensemble des régulations survenant après la synthèse de l'ARNm et jusqu'à la synthèse de la protéine constituent les régulations post-transcriptionnelles. Elles peuvent être divisées en deux parties : (i) régulation de la stabilité de l'ARNm et (ii) régulation de la traduction.

II.B.1. Régulation de la stabilité des ARNm

La quantité d'un ARNm dans la cellule résulte de sa vitesse de synthèse via la transcription, de sa vitesse de dégradation et de sa dilution. La dilution des ARNm, de l'ordre de l'heure est généralement négligeable face à leur dégradation de l'ordre de la minute. La dégradation des ARNm est associée à la notion de stabilité définie par le temps de demi-vie d'un ARNm dans la cellule, c'est-à-dire, par le temps au bout duquel sa concentration a été

divisée par deux. La stabilité des ARNm est variable sur l'ensemble des transcrits du génome avec des temps de demi-vie allant d'une à minute à plus d'une heure (Bernstein *et al.*, 2002; Esquerré *et al.*, 2014; Selinger *et al.*, 2003). Les ARN peuvent être classés selon leur temps de demi-vie : on distingue d'une part les ARN peu stables dont le temps de demi-vie est de l'ordre de quelques minutes (cas général des ARNm); (Rauhut and Klug, 1999), et d'autre part les ARN stables correspondant aux ARNr et ARNt (Deutscher, 2006). De nombreuses données soulignent l'importance de la dégradation des ARNm comme processus régulant l'expression génique et non seulement comme un simple mécanisme permettant de recycler le pool de ribonucléotides (Esquerré *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 1984; Vytvytska *et al.*, 1998, Takayama *et al.*, 2000).

i. Dégradation des ARNm

Le processus de dégradation des ARNm implique deux types de nucléases : les endonucléases, capables de couper à l'intérieur des ARNm, et les exonucléases 3'-5' ou 5'-3' qui dégradent les ARNm à partir de leurs extrémités 3' ou 5'. Chez *E. coli*, l'endonucléase principale est la RNase E (Carpousis *et al.*, 2009). Même si aucune séquence spécifique de clivage n'est connue pour cette enzyme, celle-ci coupe toujours dans des régions simple brin riches en acides nucléiques A/U (McDowall *et al.*, 1994). La RNase G partage 40% d'homologie avec la RNase E et participe également à la dégradation des ARNm (Umitsuki *et al.*, 2001). D'autre part, on retrouve différentes exonucléase à activité 3'-5' : la RNase R, la RNase II ou encore la PNPase (Zuo and Deutscher, 2001).

La majorité des dégradations des ARNm est effectuée par un complexe protéique appelé dégradosome (Carpousis *et al.*, 1994; Py *et al.*, 1994, 1996). Celui-ci est constitué de quatre enzymes : l'endonucléase RNaseE, l'exonucléase 3'-5' PNPase, l'ARN hélicase RhlB et l'énolase. Alors que la fonction des trois premières enzymes est bien caractérisée, celle de l'énolase, enzyme glycolytique catalysant l'interconversion du 2-phosphoglycérate en phosphoenolpyruvate (PEP), reste encore mal définie (Carpousis, 2007; Py *et al.*, 1996).

Plusieurs études effectuées chez *E. coli* ont permis de déterminer un modèle général du processus de dégradation des ARNm. La dégradation est initiée par une endonucléase, la RNase E dans la plupart des cas (Carpousis *et al.*, 2009). Cette coupure endoribonucléolytique

est l'étape limitante du processus et requière, pour certains ARNm, une étape préalable de déphosphorylation en 5' par l'enzyme RppH (Bouvier and Carpousis, 2011; Rauhut and Klug, 1999) (« Voie d'entrée 5'-dépendante » - Figure 4.a). Ce premier clivage produit des fragments d'ARNm qui sont alors dégradés jusqu'à l'état de monoribonucléotides par des exonucléases à activité 3'-5' (Carpousis, 2002). L'action d'une hélicase et/ou de la Poly(A) polymérase I (PAP) permet(tent) de supprimer des structures secondaires qui peuvent limiter la progression des exonucléases (Mackie, 2013). Les endonucléases contribuent également à la dégradation de ces fragments en les re-clivant en fragments de plus en plus petits (Figure 4).

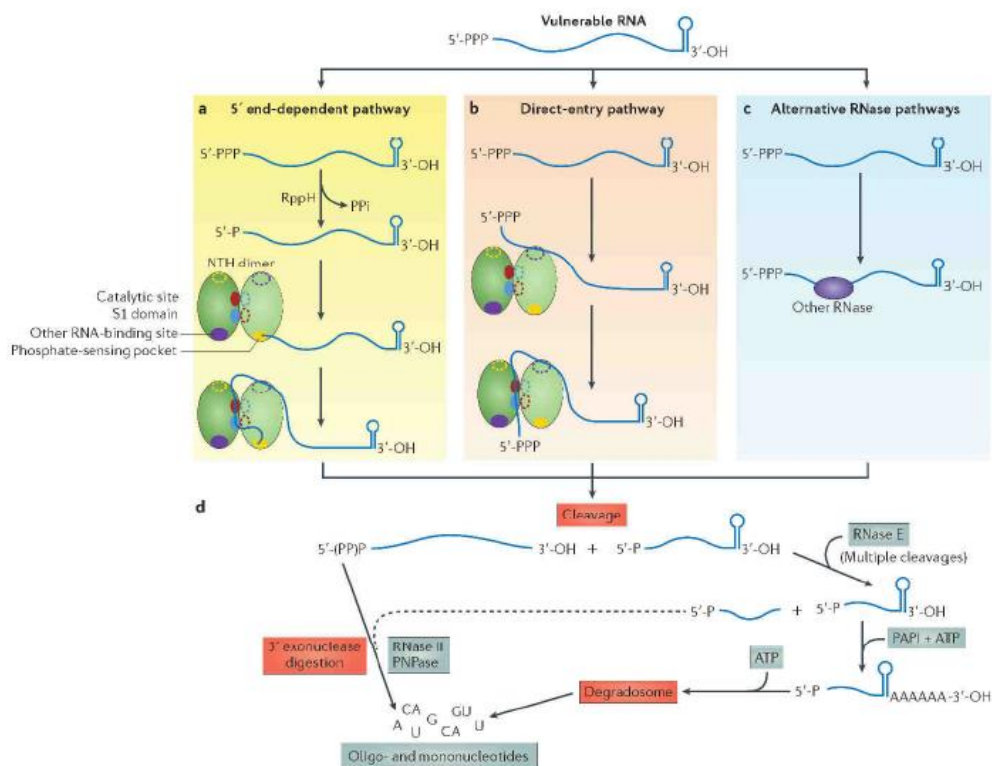


Figure 4 : Modèle de dégradation des ARNm. a) « Voie d'entrée 5'-dépendante » : la détection par la RNase E requière une extrémité 5' monophosphate. b) « Entrée directe » : la détection par la RNase E est indépendante de l'extrémité 5'. c) « Initiation par d'autres endoribonucléases ». d) Suite à l'initiation par clivage endoribonucléolytique la dégradation se poursuit par l'action combinée des exo et endoribonucléases. (Mackie, 2013)

ii. Mécanismes de régulation de la stabilité des ARNm

La stabilité des ARNm peut dépendre uniquement de la structure de l'ARNm et/ou de l'action de ligands de poids moléculaire plus ou moins faible.

La structure d'un ARNm est un déterminant de sa stabilité. La présence de structures secondaires au niveau de l'extrémité 5' UTR de l'ARNm le protège de l'attaque de certaines endonucléases (Arnold *et al.*, 1998). Au contraire, l'ajout d'une queue poly-adenylée par la poly(A) polymérase I à la suite de la structure tige boucle en extrémité 3' de l'ARNm, crée un nouvel accès de clivage aux exoribonucléases (Carpousis, 2007; Dreyfus and Régnier, 2002) et diminue la stabilité de certains ARNm (Figure 4.D).

Des ARN non codants (ARNnc) sont capables de s'apparier à des ARNm cibles au niveau de leur séquence codante ou dans la région d'initiation de la traduction (Bouvier *et al.*, 2008; Pfeiffer *et al.*, 2009). Ceci peut provoquer la dégradation ou la stabilisation des ARNm. La plupart des ARNnc requièrent l'intervention d'une protéine comme Hfq (Lay *et al.*, 2013; Massé *et al.*, 2003; Sauer, 2013; Vogel and Luisi, 2011)(Figure 5). Cette protéine est un régulateur global promouvant les interactions entre les ARNnc et leurs cibles. Elle est impliquée dans la régulation de nombreux phénomènes physiologiques comme la synthèse de bactériocines, la virulence ou la fixation du nitrate (Vogel and Luisi, 2011). Des travaux ont mis en évidence une interaction directe entre Hfq et la RNase E qui permet de cibler les transcrits spécifiquement et de les dégrader (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005) (Figure 5 – scénario de droite). Cependant, quand l'appariement entre l'ARNnc et l'ARNm cible s'effectue dans la région d'initiation de la traduction, il semble que ce soit l'absence de l'initiation de la traduction qui provoque la dégradation de l'ARNm (Figure 5 – scénario de gauche). Une étude a montré que, dans certains cas, la protéine Hfq interagit seule avec un ARNm et entraîne sa déstabilisation (Salvail *et al.*, 2013).

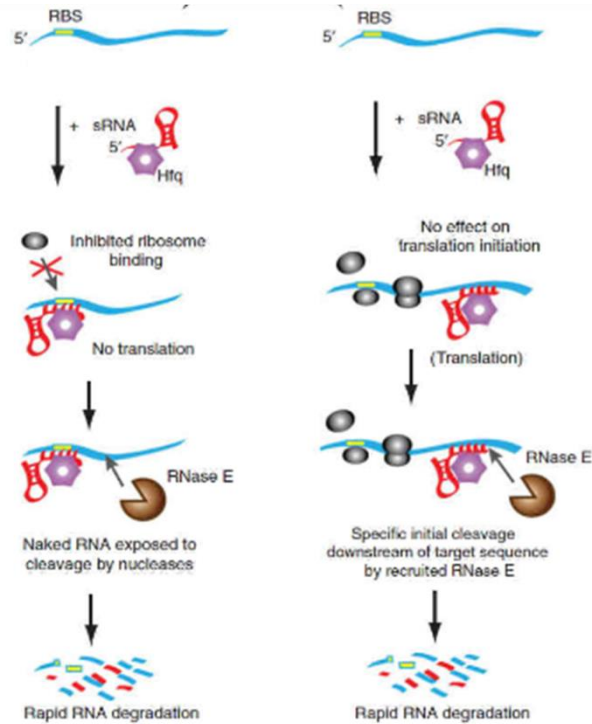


Figure 5 : Régulations de la stabilité des ARNm et de la traduction par les ARNnc, Hfq et la RNase E. (Górna *et al.*, 2012). Dans l'exemple de gauche, l'ARNnc s'apparie à l'ARNm grâce à Hfq, au niveau de la région d'initiation de la traduction et entraîne la dégradation de l'ARNm par la RNase E suite à l'absence de traduction. Dans l'exemple de droite, l'ARNnc s'apparie à l'ARNm grâce à Hfq, au niveau de la séquence codante et entraîne la dégradation de l'ARNm par la RNase E suite à son recrutement par Hfq.

D'autres protéines interagissent également avec des ARNm cibles et régulent leur stabilité. Des protéines ribosomales présentes en excès dans la cellule, s'associent à leur ARNm et diminuent la stabilité de ces derniers, ce qui a pour conséquence de rétro-réguler la synthèse de ces protéines (Dennis *et al.*, 2004; Kaberdin and Bläsi, 2006). La protéine CsrA est capable de se lier à de nombreux ARNm cibles et de modifier leur stabilité. Ceci sera développé dans la partie IV de ces travaux.

La fixation de ligands de faible poids moléculaire à un ARNm peut engendrer une modification de la structure secondaire du messager et modifier sa stabilité. Ce processus appelé riboswitch correspond à l'interaction entre une petite molécule telle qu'un acide aminé ou un sucre dans la partie 5'UTR proche de la séquence RBS (Caron *et al.*, 2012; Serganov and Nudler, 2013; Vitreschak *et al.*, 2004). Alors qu'ils étaient connus pour réguler plus particulièrement l'initiation de la traduction et indirectement la stabilité des ARNm, une

étude a montré en 2012, que des riboswitchs contrôlent aussi la stabilité de messagers (Caron *et al.*, 2012)(Figure 6).

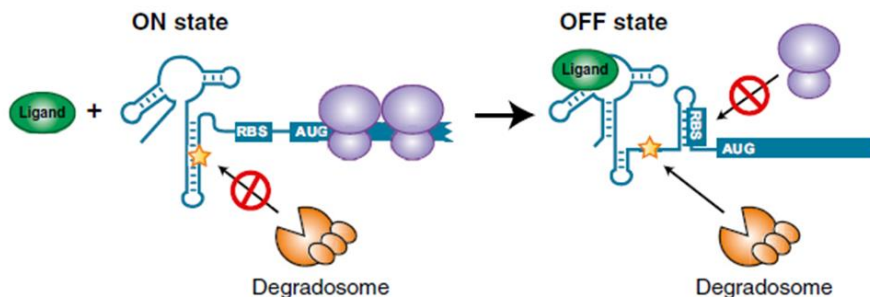


Figure 6 : Régulation de la stabilité d'un ARNm par processus de riboswitch. La fixation du ligand L entraîne une modification structurelle de l'ARNm et la libération d'un site de clivage par la RNase E. (Caron *et al.*, 2012)

Dans une moindre mesure, le processus de traduction joue également un rôle dans la détermination de la stabilité de l'ARNm. En effet, la présence de ribosomes sur l'ARNm le protège de l'activité de la RNase E. Plus le recrutement de ribosomes est efficace plus la molécule d'ARN est protégée (Arnold *et al.*, 1998; Joyce and Dreyfus, 1998). Cependant, des ribosomes inactifs mais associés à un ARNm peuvent entraîner sa déstabilisation (Hayes and Sauer, 2003; Sunohara *et al.*, 2004).

iii. Déterminants globaux de la stabilité des ARNm

Tous les mécanismes décrits ci-dessus permettent de réguler localement la durée de vie des ARNm. De façon plus globale, il est intéressant de comprendre comment la durée de vie des ARNm est déterminée et comment elle évolue au cours de la croissance et/ou en fonction des conditions environnementales. Alors que de nombreuses études ont été développées pour comprendre les différents mécanismes et les acteurs de la dégradation, l'intérêt porté à cette problématique chez *E. coli* est récent.

Récemment, une analyse des temps de demi-vie à l'échelle du génome et à différents taux de croissance pour la souche d'*E. coli* K12 MG1655 a permis de déterminer précisément différents déterminants de la stabilité des ARNm, en réponse à plusieurs études dont certains résultats étaient contradictoires (Esquerre *et al.*, 2015). Tout d'abord, la stabilité des ARNm est négativement corrélée au taux de croissance, c'est-à-dire que, plus le taux de croissance est important, plus le temps de demi-vie des ARNm est faible (Esquerré *et al.*, 2014; Esquerre

et al., 2015). Indépendamment du taux de croissance, d'autres paramètres sont déterminants pour la stabilité, le plus important étant la concentration en transcrit (Bernstein *et al.*, 2002; Esquerre *et al.*, 2015) (Figure 7). Des informations intrinsèques à la séquence de l'ARN ont également un effet sur la stabilité : le CAI (Codon Adaptation Index), la longueur de l'ORF, le pourcentage de GC de l'association 5'UTR et ORF, et la complémentarité de la séquence du RBS avec l'extrémité 3' de l'ARN 16S (Bernstein *et al.*, 2002; Feng and Niu, 2007; Lenz *et al.*, 2011; Selinger *et al.*, 2003, Esquerre *et al.*, 2015). D'autre part, la position du gène sur un gène polycistronique ainsi que l'appartenance à certaine catégorie fonctionnelle influe aussi sur la stabilité d'un ARNm (Bernstein *et al.*, 2002; Selinger *et al.*, 2003; Esquerre *et al.*, 2015). Il a aussi été observé que des gènes appartenant à la même catégorie fonctionnelle présentent la même stabilité (Bernstein *et al.*, 2002; Selinger *et al.*, 2003).

Déterminant global de la stabilité des ARNm	Corrélation Déterminant/Stabilité	Ref
Concentration des ARNm	Négative	1, 2, 3
CAI	Positive	2, 5, 6
Longuer de l'ORF	Négative	2, 5, 6
% GC	Négative	2, 5, 7
Position du gène dans l'opéron	Positive	2
Gène essentiel	Positive	2
Certaine catégorie fonctionnelle	Positive et Négative	2
Complémentarité du RBS avec l'extrémité 3' de l'ARN16S	Positif	2

Figure 7 : Paramètres déterminants de la stabilité des ARNm. 1 : Esquerre *et al.*, 2014, 2 : Esquerre *et al.*, 2015, 3 : Bernstein *et al.*, 2002, 4 : Sellinger *et al.*, 2003, 5 : Feng et Nui, 2007, 6 : Lenz *et al.*, 2011

L'évolution générale de la stabilité des ARNm en réponse à un changement environnementale a peu été étudiée. En 1998, Kuzj et ses coéquipier expliquent que trois catégories d'ARNm peuvent être définies en fonction de l'évolution de leur stabilité au moment de l'entrée en phase stationnaire : (i) les ARNm dont la stabilité augmente, (ii) les ARNm dont la stabilité diminue et (iii) les ARNm dont la stabilité ne change pas. Cependant, cette étude n'a pas été réalisée à l'échelle complète du génome. Deux études de ce genre ont cependant été effectuées, une chez *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) (Redon *et al.*, 2005) et l'autre sur la levure (Shalem *et al.*, 2008). Chez *L. lactis* une augmentation globale de la stabilité des ARNm est observée durant l'entrée en phase stationnaire, ce qui souligne une corrélation entre adaptation et régulation de la stabilité des ARNm. L'importance de facteurs environnementaux comme le pH, la température ou l'oxygène sur la stabilité des ARNm n'a

été abordée qu'à l'échelle de quelques ARNm (Albertson and Nyström, 1994; Georgellis *et al.*, 1993; Gualerzi *et al.*, 2003; Kuzj *et al.*, 1998). Il a pourtant été démontré qu'à basse température des structures secondaires pouvaient apparaître sur les transcrits et perturber leur traduction. Il est alors possible d'envisager l'impact de tels facteurs sur la stabilité des transcrits à l'échelle de la cellule.

II.B.2. Régulation de la traduction

La traduction est effectuée dans la cellule par les ribosomes, complexes ribonucléiques composés de deux sous-unités (la sous-unité 50S et la sous-unité 30S) (Kaczanowska and Rydén-Aulin, 2007; Yusupova and Yusupov, 2015). Tout comme la transcription, la traduction se divise en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La régulation de ce processus contribue à ajuster le niveau de protéines dans la cellule en fonction des besoins, de la croissance et des conditions environnementales.

La concentration intracellulaire de ribosome varie en fonction du taux de croissance : plus le taux de croissance est important, plus la concentration en ribosomes est élevée (Bremer and Dennis, 1996; Ehrenberg *et al.*, 2013). En phase stationnaire, la synthèse des ribosomes est fortement diminuée : d'une part la synthèse des ARN ribosomiaux et des protéines ribosomiales est inhibée par le (p)ppGpp accumulé dans la cellule (Srivatsan and Wang, 2008) et d'autre part la traduction des protéines ribosomiales est inhibée par un processus de rétrocontrôle (Dennis *et al.*, 2004; Kaberdin and Bläsi, 2006). La diminution de la traduction en phase stationnaire est également possible grâce à une inactivation des ribosomes présents dans la cellule. Ce mécanisme, appelé « mécanisme d'hibernation des ribosomes », correspond à la dimérisation de complexes ribosomiaux en présence de facteurs RMF et HPF. Cette dimérisation aboutit à la formation de complexes ribosomiques non fonctionnels (Wada, 1998; Yoshida *et al.*, 2004). Ces structures réversibles s'associent et se dissocient très rapidement, ce qui permet une régulation rapide de la disponibilité des ribosomes pour la traduction.

L'étape d'initiation est au cœur de la régulation de la traduction (Hayashi *et al.*, 2012; Kozak, 1999, 2005). Celle-ci dépend principalement de la disponibilité du RBS pour le ribosome. L'interaction entre l'ARNm et différentes molécules (protéines, ARNnc, petits

ligands) modifie la structure de l'ARNm et l'accessibilité du RBS par le ribosome (Caron *et al.*, 2012; Desnoyers *et al.*, 2013; Duval *et al.* 2015; Fröhlich and Vogel, 2009; Hayashi *et al.*, 2012; Lalaouna *et al.*, 2013) (Figure 8).

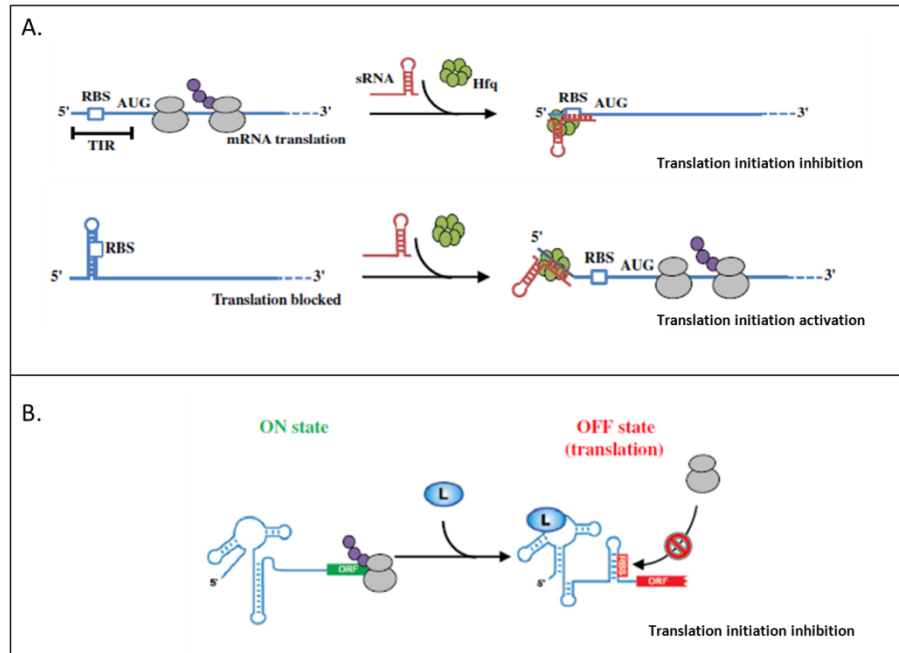


Figure 8 : Régulation de l'initiation de la traduction. **A : Régulation par l'interaction avec un ARNnc.** La fixation de l'ARNnc entraîne une séquestration du RBS (inhibition de la traduction) ou provoque sa libération d'une structure secondaire (activation de la traduction). **B. Inhibition de la traduction par un processus de riboswitch.** La fixation du ligand L entraîne une modification conformationnelle de l'ARNm et un emprisonnement du RBS dans la structure. D'après (Lalaouna *et al.*, 2013)

Dans une moindre mesure, l'initiation peut également être limitée par l'activité des facteurs d'initiation (Milon *et al.*, 2006, 2010; Milón and Rodnina, 2012). Au nombre de trois (IF1, IF2 et IF3), ces facteurs sont impliqués dans le bon positionnement du ribosome au niveau du codon start et dans le recrutement de l'ARNt de la méthionine, premier acide aminé de chaque protéine (Boelens and Gualerzi, 2002; Laursen *et al.*, 2005).

II.C. Régulation post-traductionnelle

Une fois l'ARNm traduit en protéine, plusieurs processus cellulaires permettent aux cellules de réguler la concentration de la protéine (par dégradation) ainsi que leur activité dans le cas des enzymes. Ces différents processus sont regroupés sous le terme de régulations post-traductionnelles.

II.C.1. Régulation de la stabilité des protéines

La quantité intracellulaire d'une protéine dépend de sa synthèse et de sa dégradation. La dégradation des protéines est consommatrice d'énergie et est effectuée par un complexe protéique appelé le protéasome. Chez les bactéries, cet assemblage cylindrique résulte de l'association d'une protéine ATP-dépendante de la famille des ATPases AAA (chez *E. coli* : ClpA, ClpX et ClpY) et d'une protéase (chez *E. coli* : ClpP et ClpQ) (Mogk *et al.*, 2007; Picard *et al.*, 2009). Alors que l'ATPase AAA permet la déstructuration tridimensionnelle de la protéine à dégrader (Sauer *et al.*, 2004), la protéase procède à la dégradation de la protéine déstructurée en acides aminés (Chandu and Nandi, 2004). La détermination des cibles du protéasome est gouvernée par différents mécanismes. Tout d'abord, la présence d'acides aminés particuliers (acides aminés hydrophobes et/ou basique) au niveau de l'extrémité N terminale de la protéine (the N-end rule pathway) constitue un signal d'adressage de la protéine au protéasome (Mogk *et al.*, 2007; Picard *et al.*, 2009; Varshavsky, 1996). Ces acides aminés sont reconnus par la protéine ClpS qui adresse alors la protéine à dégrader au complexe de dégradation. D'autres protéines, appelées protéines d'adressage permettent d'adresser des protéines spécifiques au protéasome indépendamment du « N-end rule pathway » (Battesti and Gottesman, 2013). Lors de la traduction, un mécanisme de secours permet également d'adresser au protéasome un peptide naissant non conforme via l'ajout d'une étiquette SsrA par un ARN de transfert (Roche and Sauer, 1999).

L'adaptation de la cellule suite à une modification des conditions environnementales requiert un réajustement des concentrations protéiques dans la cellule. Alors que certaines sont stabilisées, d'autres sont adressées au protéasome. Par exemple, lors d'une altération de la membrane, une cascade protéolytique aboutit à la dégradation du facteur anti- σ RseA favorisant alors l'activité du facteur σ^E (Ades, 2008). Au contraire, l'un des rôles principaux des protéines chaperonnes est de maintenir l'intégrité physique des protéines et des complexes protéiques en cas de dénaturation liée à un choc thermique ou osmotique par exemple (Craig *et al.*, 1993; Parsell and Lindquist, 1993).

II.C.2. Régulation de l'activité des protéines et des enzymes

La synthèse d'une protéine dans la cellule ne garantit pas qu'elle soit active. Une protéine peut ne pas être disponible pour sa fonction car elle interagit déjà avec une autre macromolécule comme une autre protéine ou un ARN. C'est le cas des systèmes toxines-antitoxines, où la protéine dite antitoxine s'associe à la protéine toxine et bloque alors son activité (Brzozowska and Zielenkiewicz, 2013). Le contrôle d'une activité protéique par un ARN concerne généralement des protéines capables de se lier aux acides nucléiques (Bobrovskyy and Vanderpool, 2013). L'exemple le plus connu est l'ARN 6S qui régule l'activité de la sous-unité σ^{70} de l'ARNpol (Wassarman and Storz, 2000). Les ARNnc CsrB et CsrC sont également capables d'interagir avec la protéine CsrA, de la séquestrer et ainsi inhiber son activité (Gudapaty *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1995a; Weilbacher *et al.*, 2003).

Les enzymes sont des protéines à activité catalytique dont l'activité est régulée par différents effecteurs métaboliques inhibiteurs ou activateurs. Par exemple, l'activité de la phosphofructokinase A (PfkA), est soumise à plusieurs régulations : la fixation d'ADP ou de GDP favorise la fixation du substrat fructose 6-phosphate suite à une modification de la structure de l'enzyme (régulation allostérique) alors que le PEP l'inhibe (Blangy *et al.*, 1968; Fraenkel *et al.*, 1973). L'ATP, co-substrat de cette enzyme, est également un inhibiteur de son activité (Zheng and Kemp, 1992). La plupart des enzymes requièrent également la présence de co-facteurs ioniques pour leur bon fonctionnement. C'est le cas par exemple de l'enzyme PfkA qui nécessite du Mg^{2+} (Blangy *et al.*, 1968). Alors que toutes ces modifications ne sont pas covalentes (*i.e* des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes ou des liaisons ioniques), les enzymes peuvent aussi subir des modifications covalentes de type acétylation ou phosphorylation qui modifient leur activité. L'ajout ou le retrait de ces groupes fonctionnels est effectué par d'autres protéines, elles-mêmes activées sous l'effet de changements environnementaux. Ces régulations constituent des voies de signalisation métaboliques ou physiologiques très importantes. C'est le cas par exemple des systèmes à double composante mentionnés dans le paragraphe II.A.2 (Hoch, 2000; Podgornaia and Laub, 2013). Chez *E. coli* l'activité d'environ 200 enzymes est contrôlée par un mécanisme d'acétylation/désacétylation. Ces modifications jouent un rôle essentiel dans la régulation de

phénomènes adaptatifs comme l'activation ou la répression de voies métaboliques (exemple du métabolisme de l'acétate et de l'activation du cycle du glyoxylate) (Castaño-Cerezo *et al.*, 2014; Holms, 1996; Kuhn *et al.*, 2014; Shinar *et al.*, 2009), la mise en place de la chimiotaxie ou encore de la réponse à un stress osmotique (Castaño-Cerezo *et al.*, 2014; Kuhn *et al.*, 2014).

L'ensemble des régulations de l'activité protéique constitue un mécanisme de régulation rapide de l'expression génique. Elles permettent aux cellules de réagir rapidement à un changement environnemental et d'augmenter leur chance de survie.

Tous ces niveaux de régulation participent à l'adaptation d'*E. coli* à son environnement et notamment à la disponibilité en nutriments. Les régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles constituent un réseau complexe de régulations responsable de l'adaptabilité du métabolisme carboné central face à la disponibilité en carbone.

III. Adaptabilité du métabolisme carboné central face à l'offre en carbone

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions chimiques permettant aux bactéries de produire de l'énergie et les éléments nécessaires à leur survie et/ou à leur multiplication. Le métabolisme peut être divisé en deux parties : la production d'énergie et des précurseurs biosynthétiques (catabolisme) et la synthèse des macromolécules cellulaires (anabolisme). Les réactions anaboliques étant consommatrices d'énergie, il est essentiel pour les cellules que l'équilibre entre catabolisme et anabolisme soit maintenu. Chez les bactéries chimio-hétérotrophes comme *E. coli*, l'énergie est issue de carbone organique à partir de réactions chimiques d'oxydoréduction.

Les voies de dégradation du carbone organique sont regroupées sous le terme métabolisme carboné central (MCC). L'adaptation et l'optimisation du MCC en fonction des conditions nutritionnelles est primordiale dans la croissance et la survie des cellules. Le MCC, ses régulations et son adaptation en fonction des ressources en carbone organique sont l'objet de cette partie. Ici, nous nous positionnons dans un contexte où seule la disponibilité en carbone dirige le MCC. Autrement dit, les cellules sont en condition aérobie et parmi les éléments nécessaires à *E. coli* seul le carbone est limitant.

III.A. Description et fonction du métabolisme carboné central (MCC)

III.A.1. Définition du MCC

Pour cette étude, les substrats carbonés sont des glucides ou de l'acétate. Le MCC, tel que défini dans ces travaux, est associé uniquement aux voies suivantes: glycolyse, voie des pentoses phosphates, voie d'Entner-Doudoroff, cycle de Krebs, gluconéogenèse et cycle du glyoxylate (Figure 9.A). Toutes ces voies contribuent à la synthèse de précurseurs biosynthétiques (Figure 9 A) et/ou à la production de molécules à haute valeur énergétique (Figure 9.B).

La glycolyse, la voie des pentoses phosphates et la voie d'Entner-Doudoroff constituent les trois voies de dégradation du glucose 6-phosphate en pyruvate (Figure 9.A : voies bleue,

orange et rose respectivement). En conditions aérobies, le pyruvate entre dans le cycle de Krebs après décarboxylation oxydative en acétyl-coenzymeA (Acétyl-coA) par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase (Reed *et al.*, 1975). Ce cycle constitue un nœud central du métabolisme puisqu'il est la voie finale du catabolisme des glucides, des acides aminés et des lipides (Figure 9.A ; voie verte). Le pool d'oxaloacétate est continuellement réapprovisionné par la réaction catalysée par la phosphoenolpyruvate carboxylase (Ppc) (Kameshita *et al.*, 1979) (Figure 9.A ; voie rouge). A l'inverse, la gluconéogenèse ou néoglucogenèse permet à partir de substrats entrant au niveau du cycle de Krebs la synthèse de tous les précurseurs biosynthétiques (Figure 9.A : voie violette). Lors de la consommation de molécules en C2 comme l'acétate, le cycle du glyoxylate est activé (Figure 9.A ; voie marron). Ce cycle permet de court-circuiter les étapes de décarboxylation du cycle de Krebs. Ainsi, des molécules carbonées simples peuvent être utilisées pour la production des précurseurs biosynthétiques (Kornberg, 1966; Lorenz and Fink, 2002).

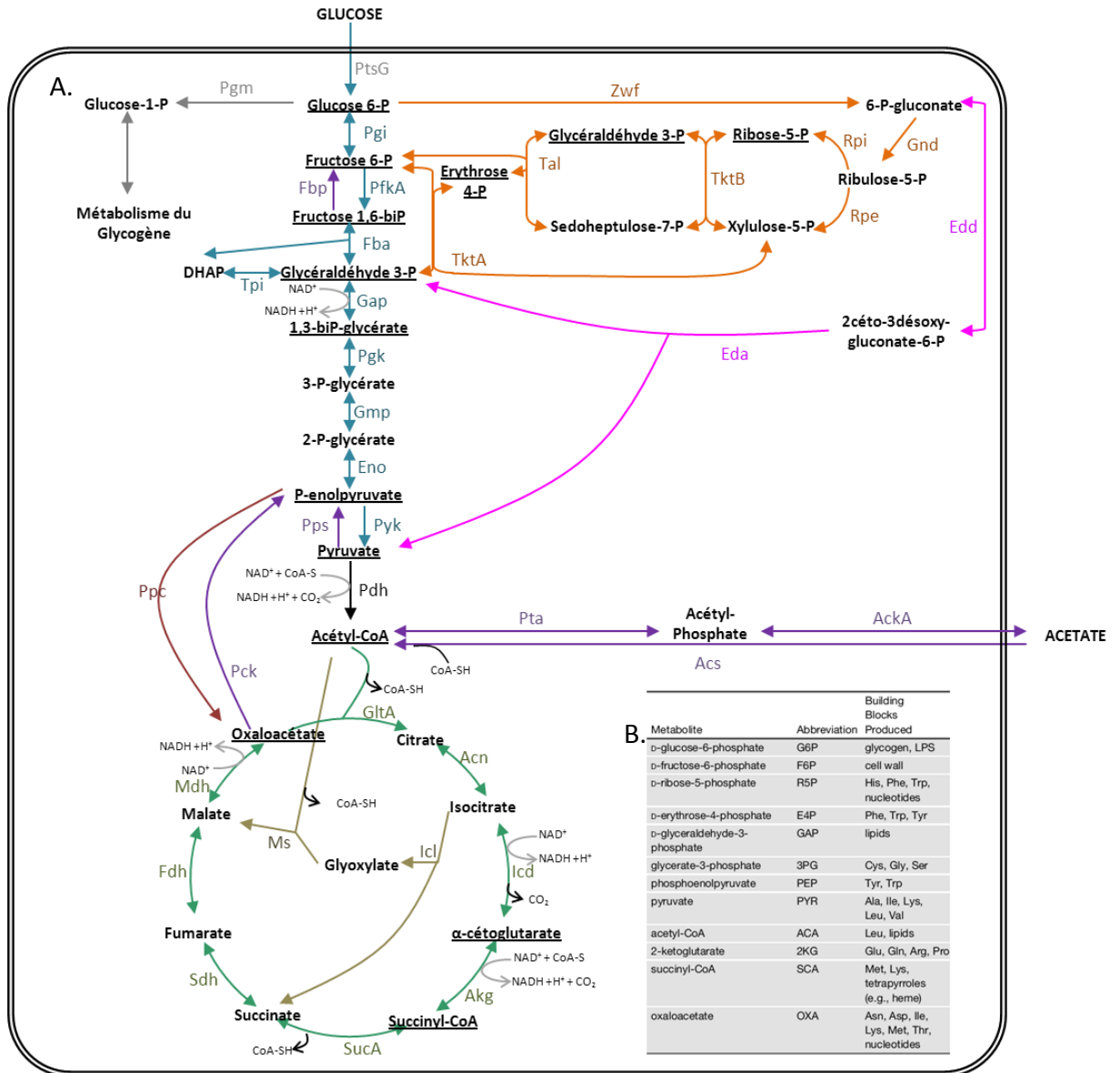


Figure 9 : Représentation du métabolisme carboné central et des précurseurs biosynthétiques cellulaires. A. Représentation des voies métaboliques du MCC. Bleu : glycolyse, Vert : cycle de Krebs, Violet : néoglucogénèse, Orange : voie des pentoses phosphate, Rose : voie d'Entner Doudoroff, Marron : shunt du glyoxylate. Les précurseurs biosynthétiques sont soulignés. **B. Précurseurs biosynthétiques indispensables à la croissance.** (Noor *et al.*, 2010). La colonne « Metabolite » contient les différents précurseurs biosynthétiques. La colonne « Building Blocks Produced » regroupe les différentes macromolécules issues des précurseurs biosynthétiques. LPS : lipopolysaccharide, His : histidine, Phe : phénylalanine, Trp : tryptophane, Tyr : tyrosine, Cys : cystéine, Gly : glycine, Ser : sérine, Ala : Alanine, Ile : isoleucine, Lys : lysine, Leu : leucine, Val : valine, Glu : glutamate, Gln : glutamine, Arg : arginine, Pro : proline, Met : Méthionine, Asn : asparagine Asp : aspartate.

III.A.2. Fonction du MCC

Le MCC, permet de produire l'énergie nécessaire à l'ensemble de la cellule ainsi que de synthétiser les différents précurseurs biologiques indispensables à la cellule (Holms, 1996; Smith, 1992) (Figure 9.B). Il est possible de définir deux catégories de besoins énergétiques :

les besoins couplés à la croissance (réplication de l'ADN, synthèse des composants de la machinerie cellulaire et synthèse de constituants des nouvelles cellules en formation) (Bremer and Dennis, 1996; Maitra and Dill, 2015) et les besoins non couplés à la croissance appelés « énergie de maintenance » (régulation du pH, de la mobilité et régulation osmotique) (Marr *et al.*, 1963; McGrew and Mallette, 1962). En croissance, les cellules requièrent à la fois de l'énergie couplée à la croissance et de l'énergie de maintenance (Bremer and Dennis, 1996; Maitra and Dill, 2015). Durant une phase stationnaire (absence de croissance des cellules et persistance dans leur environnement), seuls les besoins énergétiques et biosynthétiques non couplés à la croissance persistent. Cette énergie permet de conserver l'activité minimale des cellules en phase stationnaire incluant le maintien des composants cellulaires, la régulation osmotique des cellules, la régulation de leur pH et de leur mobilité (Marr *et al.*, 1963; McGrew and Mallette, 1962).

Le MCC s'ajuste en fonction de l'offre en substrats carbonés et des besoins de la cellule. L'adaptation du MCC est issue de la combinaison de régulations hiérarchiques (modification de la concentration des enzymes du MCC par des processus cellulaires tels que la traduction, les régulations post-transcriptionnelles et la transcription) et de régulations métaboliques (modification de l'activité des enzymes dues à une modification en substrat, produit ou effecteurs de l'enzyme) (Gerosa and Sauer, 2011; Kuile and Westerhoff, 2001).

III.B. Optimisation du MCC en présence de glucose

En présence de plusieurs sources de carbone, les bactéries consomment ces substrats de façon simultanée (Hermsen *et al.*, 2015; Lendenmann *et al.*, 1996) ou de façon séquentielle (Baev *et al.*, 2006; Beg *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2004; Fabich *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2013). Si aucun substrat carboné n'est présent en quantité suffisante pour soutenir une croissance exponentielle, alors les bactéries les consomment simultanément (Lendenmann *et al.*, 1996). *A contrario*, si plusieurs substrats sont présents en quantité suffisante, les bactéries sélectionnent la ressource leur conférant la meilleure croissance (Baev *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2004; Monod, 1941) : le glucose dans le cas d'*E. coli* (Gutierrez-Ríos *et al.*, 2007 ; Monod, 1941).

Différentes régulations du MCC concourent à l'optimisation de la croissance en présence de glucose : la répression catabolique permet d'empêcher la consommation de toute autre source carbonée et la régulation des flux métaboliques permet de maintenir l'équilibre entre les besoins anaboliques et la capacité catabolique des cellules.

III.B.1. Assimilation du glucose et répression catabolique

i. Le PTS glucose

Chez *E. coli*, il existe différents systèmes permettant de transporter le glucose dans le cytoplasme : le transporteur PEP-phosphotransférase glucose (PTS glucose) (Kundig *et al.*, 1964), le PTS mannose (Hunter et Kornberg, 1979), ou encore les différents systèmes de transport du galactose (McDonald *et al.*, 1997). Lorsque que le glucose est présent en grande quantité, son transport est majoritairement effectué par le PTS glucose qui présente une plus grande affinité pour ce substrat que les autres transporteurs (Death et Ferrenci, 1993; McDonald *et al.*, 1997). Ce transporteur appartient à la catégories des transporteurs de sucres dits « groupes de translocation » et permet l'assimilation et la phosphorylation simultanées du glucose ainsi transporté (Siebold *et al.*, 2001). Le glucose se trouve alors sous forme de glucose 6-phosphate dans la cellule (Kundig *et al.*, 1964). Le donneur de phosphate durant ce transfert est le phosphoenolpyruvate (PEP) (Figure 10). Le transport se fait en deux étapes catalysées par l'enzyme EI (Figure 10) et le complexe enzymatique EII (Deutscher, 2006). L'enzyme EI (*ptsI*) catalyse le transfert du groupement phosphate du PEP sur la protéine intermédiaire HP-r (*ptsH*) ($\text{PEP} + \text{HPr} \rightleftharpoons \text{Pyruvate} + \text{HPr}\approx\text{P}$). EII catalyse ensuite le transfert du groupement phosphate de $\text{HPr}\approx\text{P}$ au glucose (Figure 10). Le complexe enzymatique EII est composé de trois enzymes $\text{EIIA}^{\text{Glc}}/\text{EIIBC}^{\text{Glc}}$ (Glc pour glucose), les gènes codant pour chaque sous-unité sont *crr* et *ptsG* (Begley *et al.*, 1982). L'unité A est cytoplasmique et les unités B et C sont associées à la membrane. Alors que les unités A et B participent à la phosphorylation, l'unité C permet le transport du glucose (Robillard and Broos, 1999).

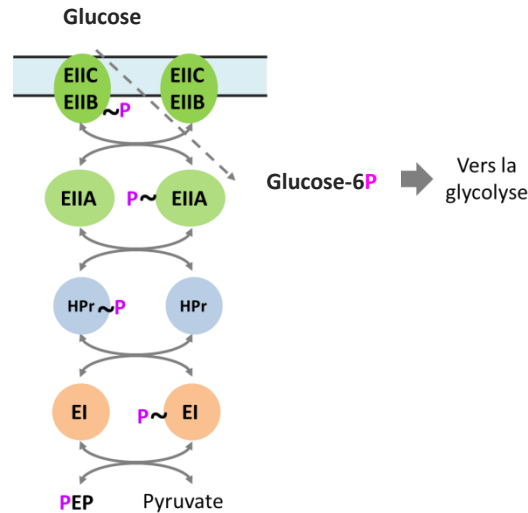


Figure 10 : Transport du glucose via le système PTS Glucose. Le glucose et le fructose peuvent être transportés par le système PTS Glucose. Le substrat est transporté sous forme phosphorylée dans la cellule. Le transport et la phosphorylation sont effectués par la sous-unité membranaire EIIIC^{Glc} du complexe EIIA^{Glc}/EIIIC^{Glc}. Le groupement phosphate est issu d'une molécule de PEP et est transféré jusqu'au complexe EIIA^{Glc}/EIIIC^{Glc} par l'intermédiaire de l'enzyme EI et de la protéine HPr.

ii. La répression catabolique

L'assimilation du glucose par le PTS glucose entraîne le phénomène de répression catabolique qui réprime les voies métaboliques contribuant à la consommation ou au métabolisme d'une seconde source de carbone (Borirak *et al.*, 2014; Deutscher, 2008; Deutscher *et al.*, 2006; Kremling *et al.*, 2014). Deux mécanismes principaux concourent à la mise en place de cette répression : le blocage de l'activité des transporteurs de substrats alternatifs et la régulation de facteurs de transcriptions impliqués dans le métabolisme de sources de carbone alternatives. De nombreuses études ont permis d'explorer ce processus (pour review : Deutscher *et al.*, 2006). Tout d'abord, l'assimilation de tout autre sucre que le glucose est évitée par un mécanisme dit « exclusion de l'inducteur » (inducer exclusion) (Brückner and Titgemeyer, 2002). En présence de glucose, la sous-unité EIIA^{Glc} se trouve majoritairement sous forme non phosphorylée et se lie à différentes perméases catalysant le transport de ressources alternatives comme le lactose, le maltose, le mélibiose ou le raffinose (Figure 11). Le transport de ces substrats est inhibé ainsi que la production d'inducteurs de leurs voies métaboliques. EIIA^{Glc} non phosphorylée est capable de se lier à l'enzyme glycérol kinase ce qui contribue à l'inhibition de la voie métabolique du glycérol (Brückner and Titgemeyer, 2002).

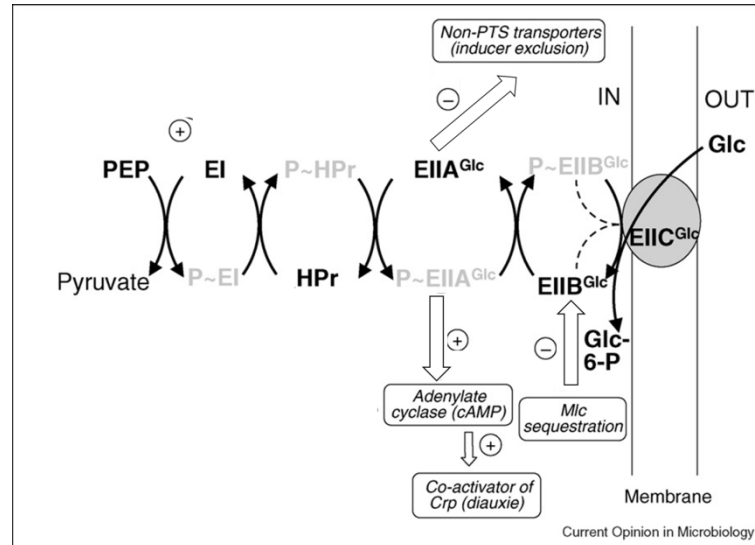


Figure 11 : Répression catabolique et rôle du PTS Glucose. D'après (Deutscher, 2008). L'assimilation continue du glucose provoque une déphosphorylation du système PTS glucose et de ses composantes. Ce qui a pour conséquence d'inhiber le transport d'autres substrats, de maintenir la concentration du régulateur transcriptionnel cAMP/Crp à un faible niveau et de séquestrer le régulateur post transcriptionnel Mlc.

Un second élément clé de la répression catabolique est le régulateur transcriptionnel Crp qui, activé par la fixation d'une molécule d'AMP cyclique (AMPC), régule l'expression de plus de 180 gènes dont certains sont impliqués dans le catabolisme de ressources alternatives au glucose (Zheng *et al.*, 2004). La répression catabolique, se traduit par la diminution de la concentration du complexe AMPC/Crp et donc par l'absence d'induction des voies activées par ce complexe. Sous forme phosphorylée (en l'absence de glucose), P~EIIA^{Glc} active l'adénylate cyclase et la synthèse de AMPC par l'intermédiaire d'une molécule encore non identifiée (Park *et al.*, 2006). Ainsi, lorsqu' EIIA^{Glc} n'est pas phosphorylée (en présence de glucose), l'activité de l'adénylate cyclase est fortement diminuée provoquant une baisse de la concentration en AMPC.

D'autres régulateurs globaux comme Mlc ou Cra sont impliqués dans la régulation du catabolisme du glucose et dans la mise en place de la répression catabolique (Deutscher *et al.*, 2006). Chez *E. coli*, Mlc régule l'expression de la protéine HPr, des autres transporteurs de glucose, de maltose et de mannose, du facteur de transcription MalT, de l'ARNnc SgrS et régule également sa propre expression (Deutscher, 2008). En présence de glucose, ce facteur de transcription est inactivé par liaison à la sous-unité EIIB^{Glc} non phosphorylée et ne peut

alors promouvoir l'expression de ces cibles et la consommation de substrats tels que le mannose ou le maltose (Tanaka *et al.*, 2004)(Figure 12).

III.B.2. Régulation des flux métaboliques par les « senseurs » de flux

Durant la phase exponentielle de croissance tous les constituants cellulaires doivent doubler à la même vitesse (Scott and Hwa, 2011). Les flux du MCC doivent permettre de fournir de façon constante et suffisante l'énergie et les précurseurs nécessaires à ce doublement cellulaire régulier ainsi qu'à la production de l'énergie de maintenance (Holms, 1996). De façon à maintenir cet équilibre entre capacité anabolique et consommation du substrat, les flux métaboliques sont régulés d'une part par la régulation des quantités d'enzymes catalysant ces flux (régulation hiérarchique) et d'autre part la régulation de l'activité de ces enzymes par leurs effecteurs (régulation métabolique) (soulignés dans Figure 12). Ces deux niveaux de régulation sont à l'origine de régulations croisées et de nombreuses boucles de régulation. Des métabolites clés jouent un rôle de « senseur » de flux («Flux sensor») et la variation de leur concentration entraine un ajustement des flux du MCC (Kotte *et al.*, 2010) (Figure 12).

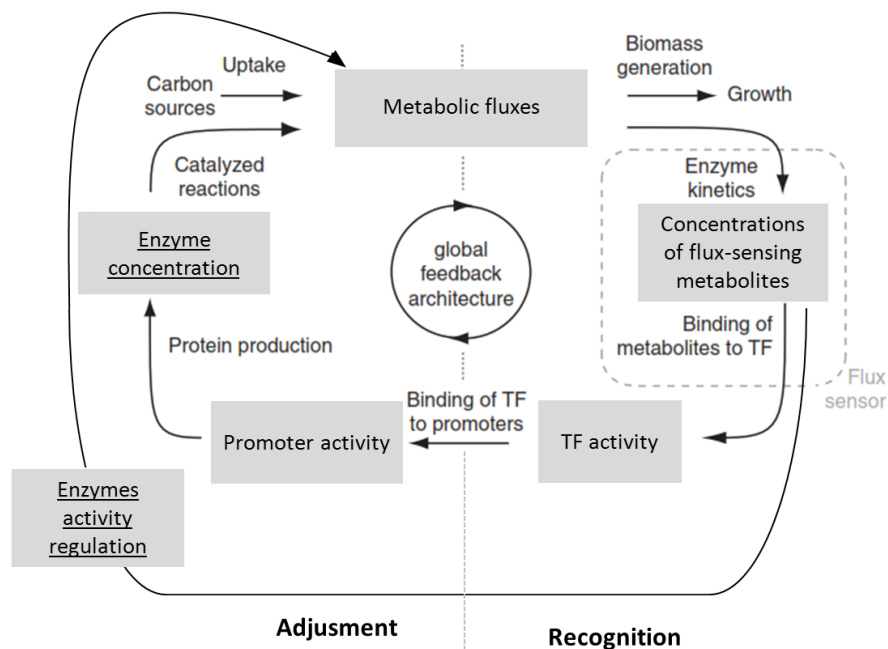


Figure 12 : Représentation de la régulation des flux du MCC et rôle des « Flux sensor ». Deux méthodes sont mises en place pour contrôler les flux métaboliques. La première permet d'ajuster le niveau intracellulaire des enzymes catalysant les flux par l'action de facteurs de transcriptions activés par différents métabolites. La deuxième consiste à modifier l'activité des enzymes catalysant les flux par l'effet d'effecteurs métaboliques (Kotte *et al.*, 2010)

i. Régulation métabolique des flux

Certains métabolites « senseurs » sont des effecteurs directs de l'activité d'enzymes du MCC (Figure 12), par leur rôle de substrat, de produit, d'inhibiteur et/ou d'activateur de ces enzymes. Par exemple, le FBP, « senseur » de flux principal du métabolisme glycolytique (Kochanowski *et al.*, 2013), est un activateur allostérique de la pyruvate kinase. Ainsi, une importante concentration de FBP favorise l'activité de la pyruvate kinase Pyk située 5 réactions plus loin dans la voie. Ce contrôle constitue une boucle de régulation positive de la glycolyse (Zaid Siddiquee *et al.*, 2004). Au contraire, le PEP est un inhibiteur de la phosphofructokinase A (PfkA) (Blangy *et al.*, 1968) : une trop forte concentration de ce substrat 5 réactions en aval de la PfkA aboutit à la diminution du flux au travers de cette enzyme constituant ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif.

ii. Régulation hiérarchique des flux

Des métabolites « senseur de flux » interagissent également avec des régulateurs transcriptionnels et modifient l'expression de gènes codant pour des enzymes du MCC (Figure 12). C'est le cas, par exemple du FBP qui inhibe l'activité du facteur transcriptionnel Cra dont les cibles de répression sont des gènes glycolytiques et les cibles d'activation des gènes gluconéogéniques (Kochanowski *et al.*, 2013; Ramseier *et al.*, 1995). Le stress aux hexoses phosphate est un autre exemple d'une régulation des flux métaboliques par activation d'un facteur de transcription. L'accumulation de glucose 6-phosphate et fructose 6-phosphate entraîne, par un mécanisme encore incompris mais impliquant probablement une déplétion du pool de PEP, l'activation de la protéine SgrR qui active alors la transcription de l'ARN non codant SgrS (Kimata *et al.*, 2001; Morita *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2013) (Figure 13). SgrS inhibe, via un mécanisme Hfq dépendant (Maki *et al.*, 2010; Morita *et al.*, 2005), la traduction de l'ARNm *ptsG* (codant pour la sous-unité perméase EIIC du système PTS du glucose) et de l'ARNm de *manXYZ*, transporteur secondaire du glucose, ce qui diminue de fait les flux d'assimilation du glucose (Morita *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2012). SgrS active l'expression de YigL, phosphatase du glucose 6-phosphate (Sun *et al.* 2013), le glucose dé-phosphorylé est alors sécrété dans le milieu extracellulaire (Figure 13). Ainsi cette régulation réorganise les flux

métaboliques afin de désengorger les pools de glucose 6-phosphate et fructose 6-phosphate et réduire leur toxicité (Irani and Maitra, 1977; Kadner *et al.*, 1992).

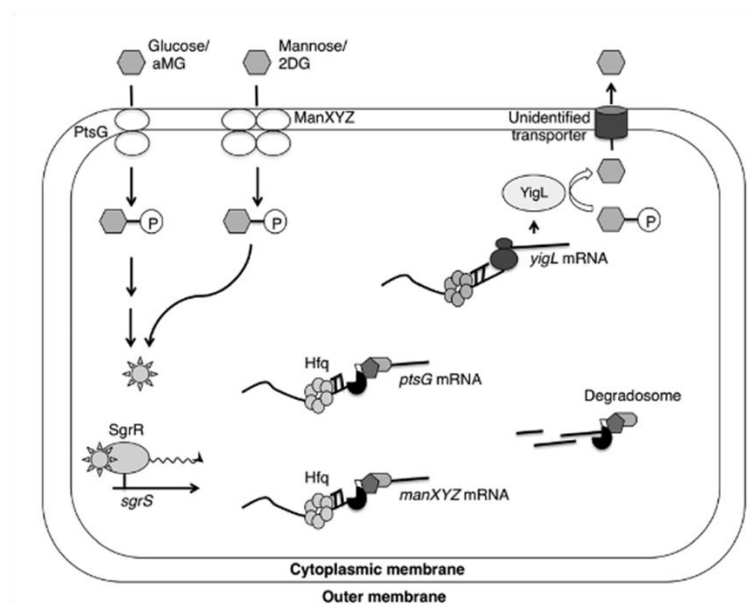


Figure 13 : Représentation du stress aux hexoses phosphates (Sun and Vanderpool, 2013). L'accumulation d'hexoses phosphorylés provoque un signal encore indéterminé (soleil) aboutissant à l'activation de la protéine SgrR qui active la transcription de l'ARN non codant SgrS. SgrS inhibe la traduction de *ptsG* et *manXYZ* et active celle de *yigL* qui permet la déphosphorylation des hexoses.

III.B.3. Overflow métabolique et production d'acétate

Durant une croissance exponentielle sur glucose, le flux de carbone entrant excède rapidement la capacité du cycle de Krebs et entraîne un déséquilibre métabolique appelé overflow métabolique (Holms, 1996; Kotte *et al.*, 2014; Wolfe, 2005). La production d'acétate dans le milieu extracellulaire par les enzymes Pta et AckA à partir de l'acétyl-coenzyme A (Figure 9.A) permet de rétablir cet équilibre. Cela permettrait même d'augmenter les capacités de croissance des cellules (El-Mansi, 2004).

III.C. Adaptation du MCC suite à la disparition du glucose

Le MCC est rapidement réorganisé et optimisé en fonction des nouvelles disponibilités en carbone une fois le glucose complètement épuisé. Ceci permet aux cellules de survivre voire de poursuivre leur croissance en fonction des substrats disponibles, on parle de transition métabolique. Deux scénarios sont envisagés dans cette partie : la présence d'une

deuxième source de carbone permettant de poursuivre la croissance et l'entrée en phase stationnaire en conditions de limitation carbone.

III.C.1. Diauxie

Suite à la disparition du glucose, en présence d'un autre substrat (ex : gluconate), les bactéries réorientent leur MCC vers sa consommation et poursuivent leur croissance. Ce phénomène, appelé diauxie (Monod, 1941) est caractérisé par deux phases de croissance successives séparées par une période de latence (Lag diauxique) durant laquelle aucune croissance n'est observée (Figure 14) (Monod, 1941 Siegal, 2015). Cette période est historiquement définie comme le temps nécessaire aux cellules pour s'adapter au nouveau substrat et produire toutes les enzymes nécessaires à sa consommation (Stanier, 1951).

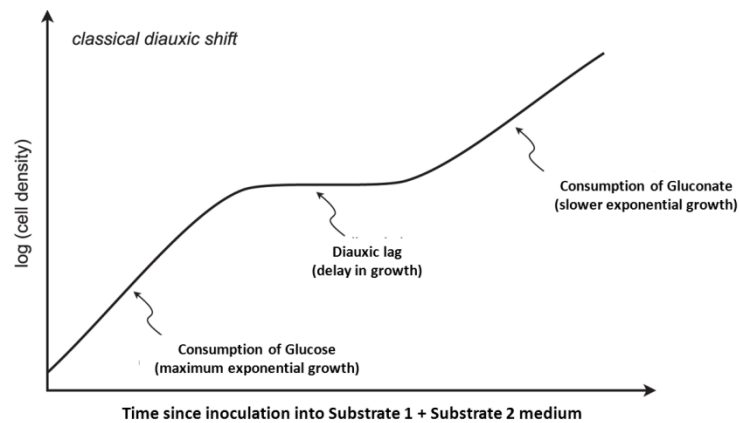


Figure 14 : Représentation d'une diauxie. Les cellules sont inoculées sur un milieu contenant deux substrats carbonés. Les cellules observent une première croissance exponentielle en consommant le substrat leur procurant la meilleure croissance (dans cet exemple : le glucose). Une fois le premier substrat consommé, la croissance semble s'arrêter avant de reprendre grâce à la consommation du deuxième substrat conférant aux cellules une croissance. (Siegal, 2015)

Durant la phase de latence, la répression catabolique imposée par le glucose est levée (Saier, 1996). Le phénomène d'exclusion de l'inducteur est supprimé, et le complexe cAMP/Crp s'accumule dans la cellule, entraînant alors l'activation de ses gènes cibles. La disparition du glucose provoque également la déplétion des métabolites de la glycolyse. Suite à la diminution du FBP, le facteur de transcription Cra n'est plus réprimé ce qui entraîne la transcription de ces cibles et la production d'enzyme de métabolismes alternatifs (Kochanowski *et al.*, 2013; Ramseier *et al.*, 1995). Ainsi, le MCC est réorganisé avec la mise en place des voies métaboliques impliquées dans l'assimilation et la consommation d'une autre

ressource présente dans le milieu (Kremling *et al.*, 2014; Traxler *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2004).

Récemment, plusieurs études indiquent la présence d'une hétérogénéité au sein des cellules durant la phase de latence (Boulineau *et al.*, 2013; Kotte *et al.*, 2014; Siegal, 2015; Solopova *et al.*, 2014). Parmi ces cellules environ 15% sont déjà adaptées à la consommation de la deuxième source de carbone et continuent de se diviser, alors que les autres entrent dans une vraie phase de latence (Boulineau *et al.*, 2013). La croissance des cellules déjà adaptées n'étant pas détectable par des techniques de mesures à l'échelle de la population telles que le suivie de densité optique, ceci se traduit par l'observation d'une absence de croissance et donc d'une phase de latence. Des approches en cellules individuelles (« Single Cell ») et de cytométrie en flux permettent d'appréhender plus spécifiquement cette question d'hétérogénéité et d'adaptation (Boulineau *et al.*, 2013; Kotte *et al.*, 2014). Kotte *et al.*, (2014) discutent l'importance du MCC dans l'origine de cette hétérogénéité. Il souligne notamment l'implication de métabolites « flux sensors » comme le FBP. Cette hétérogénéité constitue un avantage adaptatif pour les cellules capables de réorienter leur MCC sans phase de latence et de poursuivre leur croissance sur un nouveau substrat (Boulineau *et al.*, 2013).

III.C.2. Entrée en phase stationnaire

Dans le cas où aucune source de carbone capable de soutenir la croissance n'est présente, les cellules entrent en phase stationnaire.

i. Origine de l'énergie de maintenance

L'énergie de maintenance est l'énergie nécessaire à la cellule pour survivre en l'absence de croissance. La dégradation d'un composé carboné est nécessaire à la production d'une telle énergie. Ce composé peut être un substrat présent dans le milieu extracellulaire (discuté dans Enjalbert *et al.*, 2015) ou un composé de réserve, stocké dans la cellule (Wang and Wise, 2011).

Dans le premier cas, les bactéries assimilent directement la source de carbone depuis le milieu extérieur mais la consommation de cette source n'entraîne pas de croissance bactérienne (Enjalbert *et al.*, 2013, Enjalbert *et al.*, 2015). Ce phénomène est observé lors de

la transition glucose-acétate (Figure 15.A). Durant cette transition, l'acétate extracellulaire est consommé après la disparition du glucose. Cette phase est caractérisée par un découplage entre anabolisme et catabolisme de l'acétate. En effet, les gènes impliqués dans la consommation de l'acétate (*pck* et *acs*) sont activés mais ceux impliqués dans l'anabolisme de l'acétate (gène du cycle du glyoxylate) ne le sont pas (Figure 15.B). L'énergie issue du catabolisme de l'acétate est probablement utilisée uniquement dans la maintenance des cellules. Cette stratégie de découplage caractérisée par l'absence d'induction des gènes anaboliques est supposée permettre aux bactéries de restaurer rapidement une croissance dans le cas où un nouveau substrat plus favorable apparaîtrait dans l'environnement (Enjalbert *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2005)

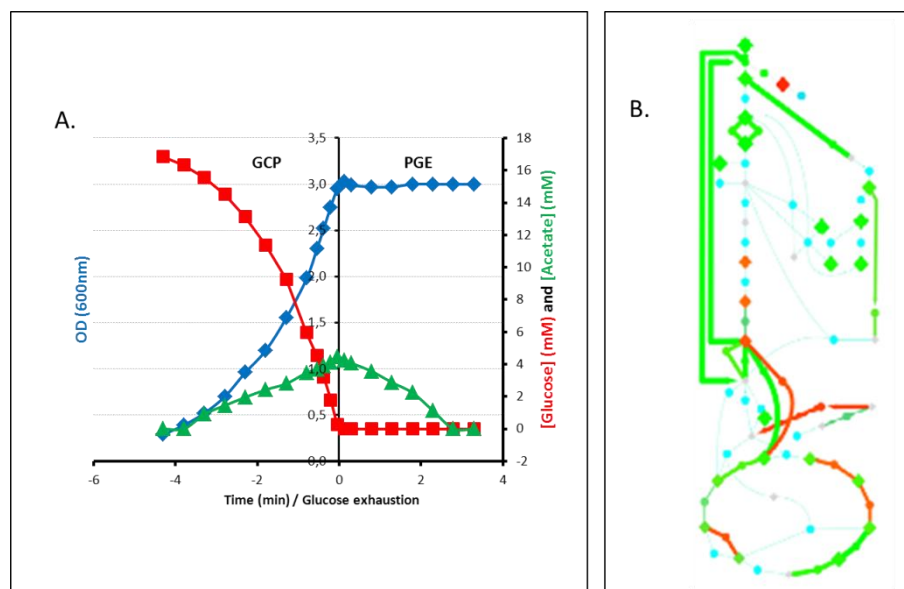


Figure 15 : Représentation de la transition glucose acétate. A. Représentation de la transition glucose acétate. Deux phases caractérisent la transition : GCP (Glucose consumption phase) et PGE (Post Glucose Exhaustion). GCP : consommation du glucose extracellulaire, accumulation extracellulaire d'acétate et croissance exponentielle. PGE : consommation d'acétate, absence de croissance. **B. Voies métaboliques actives durant la phase de consommation d'acétate.** Les voies métaboliques activées par rapport à GCP sont représentées en rouge et les voies inactivées par rapport à GCP sont en vert : activation des voies catalysées par *Acs* et *Pck* et extinction des voies glycolytiques et non activation du shunt du glyoxylate (Enjalbert *et al.*, 2013)

La dégradation de sucres de réserve constitue également une source d'énergie (Dawes and Senior, 1973; Wang and Wise, 2011). Le glycogène est, chez *E. coli*, l'un des sucres de réserve principal (Wang and Wise, 2011). Ce dernier est un polysaccharide composé d'unités glucose reliées en $\alpha 1,4$ et branchées en $\alpha 1,6$ (Preiss, 1984a). Le glycogène est connu pour

s'accumuler dans la cellule en cas de limitation nutritionnelle autre que le carbone (Preiss, 1984a). Il permettrait aux cellules de mieux survivre en cas de carence nutritive (Ribbons and Dawes, 1963; Strange, 1968; Wang and Wise, 2011). Ce polysaccharide, présent chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, constitue une forme particulièrement intéressante de stockage d'énergie. En effet, malgré son fort poids moléculaire il n'a peu voire pas d'effet sur la pression osmotique des cellules. Sa synthèse nécessite une forme activée du glucose, l'ADP-glucose, obtenue depuis la glycolyse à partir du glucose 6-phosphate. La conversion du glucose 6-phosphate en glucose 1-phosphate est catalysée par la phosphoglucomutase (Pgm) (Figure 16). Le glucose 1-phosphate est ensuite transformé en ADP-glucose par l'enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase (GlgC) (Ballicora *et al.*, 2007; Preiss, 1984a). Sous forme d'ADP-glucose, le glucose est polymérisé grâce à la glycogène synthase GlgA permettant le branchement des unités par les liaisons α 1,4. Finalement, l'enzyme GlgB (α 1,4 glucan-6-glycosyltransférase) catalyse la ramification du glycogène (Figure 16). La synthèse du polymère est fortement régulée par l'enzyme GlgC, dont la délétion supprime toute production de glycogène (Ballicora *et al.*, 2003; Preiss, 1984a). La voie de dégradation du glycogène est indépendante de celle de sa synthèse et produit directement des molécules de glucose 1-phosphate capables d'intégrer la glycolyse au niveau du glucose 6-phosphate et de contribuer à la production d'énergie pour la cellule. Une première enzyme, GlgP ou GlgY, permet de décrocher une à une les unités glucose du glycogène branché en produisant du glucose 1-phosphate (Alonso-Casajus *et al.*, 2006). Cette dégradation se poursuit jusqu'au niveau des liaisons α 1,6 et à la production de résidus dextrines limites. Une deuxième enzyme, GlgX, hydrolyse les liaisons α 1,6 de ces résidus formant des composés glycosidiques, qui après métabolisation par la voie des maltodextrines, réintègrent la glycolyse au niveau du glucose 6-phosphate (Dauvillée *et al.*, 2005) (Figure 16).

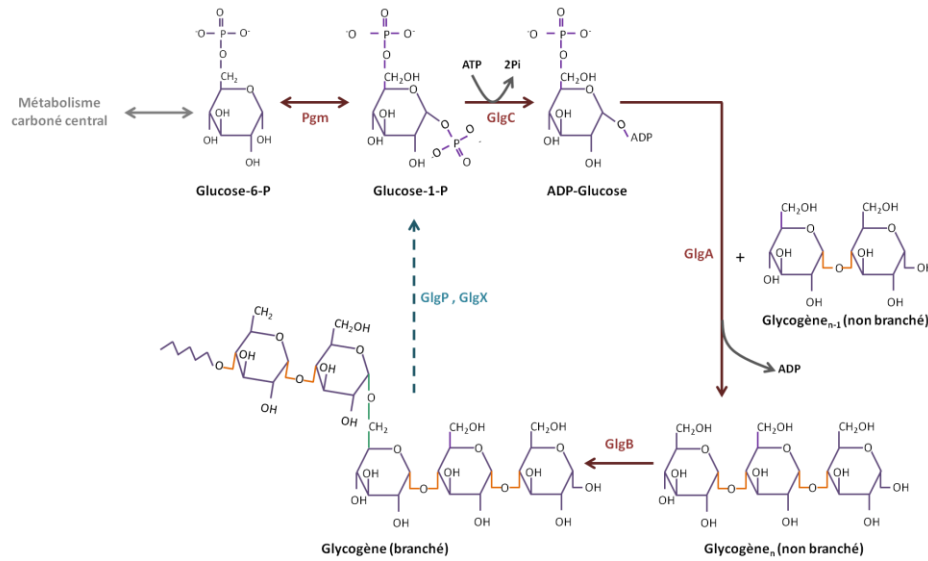


Figure 16 : Métabolisme du glycogène. La dégradation du glycogène est simplifiée (pointillés). Le glycogène est synthétisé à partir du G6P de la glycolyse par 4 enzymes. Il regagne le métabolisme carboné central au même niveau à l'issue de sa dégradation par GlgP et GlgX.

ii. Régulateurs du MCC à l'entrée en phase stationnaire

Trois régulateurs globaux sont impliqués dans la régulation du MCC en phase stationnaire : le complexe AMPc/Crp, le (p)ppGpp et le facteur σ^S (Deutscher, 2008; Görke and Stülke, 2008; Hengge, 2009a; Hengge-Aronis, 2002; Traxler *et al.*, 2006).

La levée de la répression catabolique à l'entrée en phase stationnaire entraîne une accumulation du complexe AMPc/Crp et l'activation des gènes sous contrôle de ce régulateur dont font partie les gènes associés au métabolisme des sucres de réserve (Romeo *et al.*, 1988). (p)ppGpp est un régulateur initialement connu pour réguler le métabolisme en réponse à une carence en acides aminés par un mécanisme appelé réponse stringente (Cashel *et al.*, 1996). Son implication dans la régulation de la réponse à un stress nutritionnel et dans la régulation de la phase stationnaire a ensuite été démontrée (Srivatsan and Wang, 2008). (p)ppGpp modifie l'expression génétique globale en agissant directement ou indirectement, aux niveaux transcriptionnel et post transcriptionnel. En présence de son cofacteur DksA (Paul *et al.*, 2004, 2005), (p)ppGpp régule directement la transcription de certains gènes en favorisant ou déstabilisant le complexe formé par l'ARN polymérase et leur promoteur (Barker *et al.*, 2001a, 2001b; Roberts, 2009) (Figure 17.A). Il régule également indirectement l'expression de certains gènes en favorisant l'utilisation de facteurs σ alternatifs par l'ARNpol (Jishage *et al.*,

2002) (Figure 17.A). Ainsi (p)ppGpp inhibe la transcription des gènes de la machinerie de traduction, de la synthèse du flagelle et de la chimiotaxie, du métabolisme et des transporteurs de composés carbonés. Il active la transcription de nombreux gènes, dont les différents facteurs σ RpoE, RpoH et RpoS impliqués dans la régulation de la réponse à différents stress ou les gènes de consommation des sucres de réserve (Durfee *et al.*, 2008). (p)ppGpp régule aussi la traduction en phase stationnaire, indirectement en inhibant la synthèse de la machinerie traductionnelle, et directement en inhibant l'activité des facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G (Cashel *et al.*, 1996) et en interférant avec le facteur d'initiation IF2 (Milon *et al.*, 2006) (Figure 17.B).

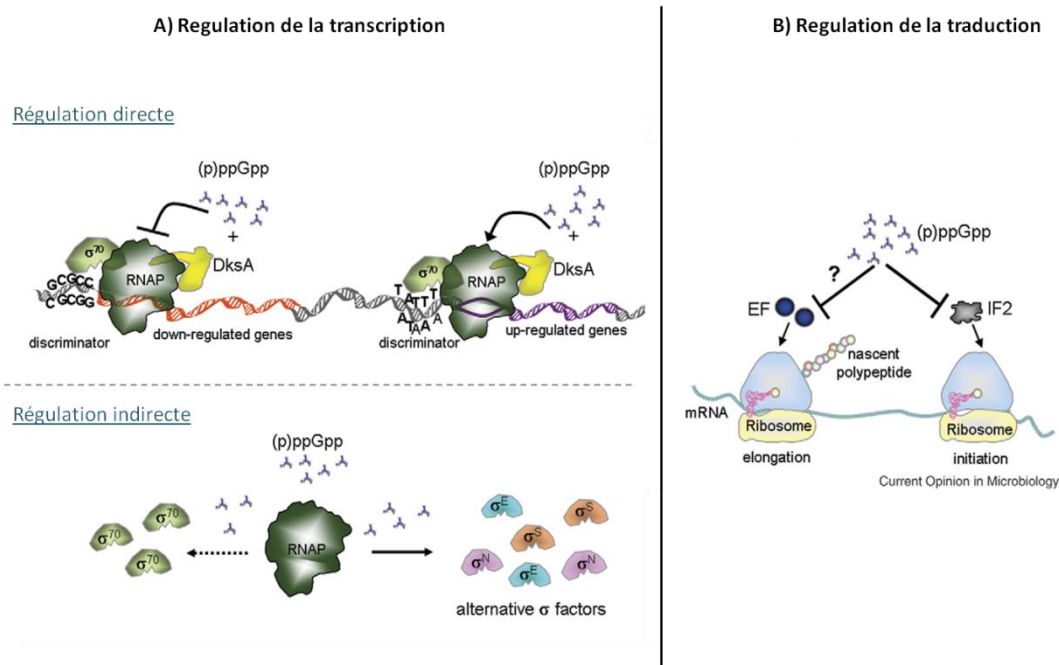


Figure 17 : Différentes régulations géniques effectuées par (p)ppGpp. A. Régulation de la transcription. (p)ppGpp régule la transcription directement en stabilisant ou déstabilisant le complexe formé par l'ARNpol et l'ADN et indirectement en favorisant l'utilisation de facteurs σ alternatif au σ^{70} . **B. Régulation de la traduction.** (p)ppGpp inhibe la traduction en inhibant les facteurs d'initiation et les facteurs d'élongation. D'après (Srivatsan and Wang, 2008)

Le facteur σ^S régule l'expression de la majorité des gènes lors de la phase stationnaire (Gentry *et al.*, 1993; Hirsch and Elliott, 2002; Lange and Hengge-Aronis, 1994). En phase de croissance σ^S est exprimé à un niveau basal mais n'est pas détectable dans la cellule en raison de sa rapide dégradation (Lange and Hengge-Aronis, 1994). En phase stationnaire, la concentration de σ^S augmente jusqu'à 1600 molécules par cellule (Piper *et al.*, 2009) suite à

l'augmentation de sa transcription (Gentry *et al.*, 1993; Hengge-Aronis, 2002; Piper *et al.*, 2009), de sa traduction (Lange and Hengge-Aronis, 1994; Muffler *et al.*, 1996; Piper *et al.*, 2009; Repoila *et al.*, 2003) et surtout suite à la diminution de sa dégradation (Bougdoor and Gottesman, 2007; Bougdoor *et al.*, 2006; Hengge, 2009b; Lange and Hengge-Aronis, 1994; Peterson *et al.*, 2005). En phase stationnaire, le temps de demi-vie de σ^S est de 10.5 minutes contre 1.4 minute en phase de croissance suite à l'activation par (p)ppGpp de la synthèse d'IraP, antagoniste de RssB, protéine adressant en continu σ^S au protéasome (Bougdoor and Gottesman, 2007; Bougdoor *et al.*, 2006). D'autre part, l'interaction entre l'ARNpol et σ^S est favorisée par (p)ppGpp et l'accumulation d'antagonistes de σ^{70} comme l'ARN6S et la protéine Rsd (Jishage and Ishihama, 1998).

iii. Dynamique de l'entrée en phase stationnaire

Les différentes interactions entre les trois régulateurs de la phase stationnaire précédemment présentés (Crp/cAMP, (p)ppGpp et σ^S) jouent un rôle très important dans la dynamique de l'adaptation des cellules et la reprogrammation de l'expression du génome (Durfee *et al.*, 2008; Traxler *et al.*, 2006, 2011). Tout d'abord, la diminution de la concentration du glucose provoque l'accumulation de (p)ppGpp et du complexe Crp/cAMP dans les cellules et l'activation de leurs régulons respectifs. L'induction du régulon σ^S est provoquée après disparition totale du glucose, suite à l'accumulation de (p)ppGpp qui entraîne la synthèse et l'activation de σ^S (Bougdoor and Gottesman, 2007; Hengge-Aronis, 2002; Jishage *et al.*, 2002; Traxler *et al.*, 2011). La réorganisation transcriptionnelle est effectuée de façon hiérarchisée dans le temps, le patron transcriptionnel s'installe généralement dans les 30 minutes suivant la carence (Durfee *et al.*, 2008; Enjalbert *et al.*, 2013; Traxler *et al.*, 2011) (Figure 18).

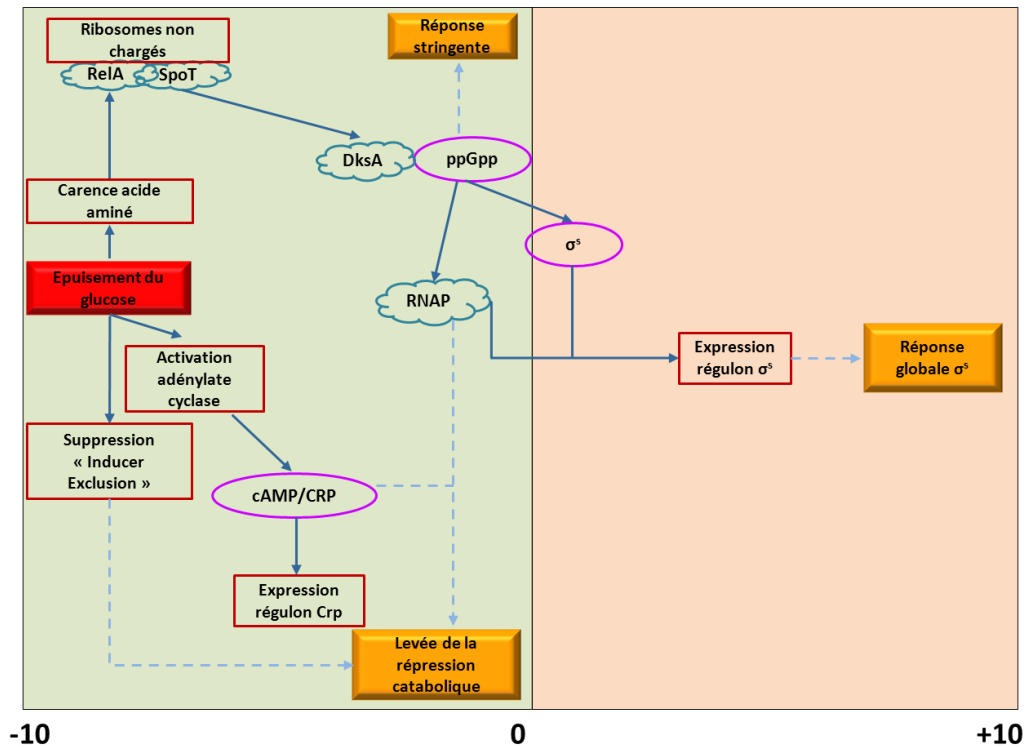


Figure 18 : Modèle de la dynamique de l'entrée en phase stationnaire et coordination des régulateurs globaux Crp, ppGpp et σ^S . Sur cette figure, les régulateurs globaux sont représentés dans les ovales violets, les encadrés rouges présentent les différents événements cellulaires et les encadrés jaunes représentent les différentes régulations globales qui en résultent. -10, 0 et +10 correspond au temps (min) par rapport à la disparition du glucose. (D'après Traxler *et al.*, 2006).

L'adaptabilité du MCC est soutenue par un réseau complexe de régulations impliquant différents régulateurs globaux intervenant à différents niveaux de la régulation de l'expression génique. Parmi eux se trouverait également le régulateur post-transcriptionnel CSR décrit dans la partie suivante.

IV. Le système de régulation post-transcriptionnel CSR

Comme abordé dans la section II, il existe différents niveaux de régulations permettant de réguler la physiologie des cellules. A chaque niveau de régulation plusieurs régulateurs globaux ont été mis en évidence. Dans cette partie, un exemple de régulateur post-transcriptionnel global, le système « Carbon Storage Regulator » (CSR) sera détaillé. Ce régulateur post-transcriptionnel régule la stabilité des ARNm et l'initiation de la traduction, les deux leviers de régulation post-transcriptionnelle.

IV.A. Description du système de régulation CSR chez *Escherichia coli*

CSR est constitué des protéines CsrA et CsrD, des deux ARNnc CsrB et CsrC et du système à double composante BarA/UvrY. Alors que CsrA est l'élément du système qui interagit directement avec les ARNm cibles, les autres composants jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de cette protéine.

IV.A.1. La protéine essentielle CsrA

CSR a comme effecteur principal la protéine CsrA (Liu *et al.*, 1995a; Romeo *et al.*, 1993a). Mise en évidence par Romeo et son équipe (Romeo *et al.*, 1993a), CsrA est un régulateur retrouvé dans environ 75% du règne bactérien (Papenfert and Vogel, 2010).

La protéine CsrA est une protéine capable de se fixer aux ARNm, de réguler leur stabilité et leur traduction (Liu *et al.*, 1995a). C'est un petit homodimère d'environ 14 kD capable de se fixer à des molécules d'ARNm grâce à la présence d'un domaine KH (Liu *et al.*, 1995a) et de boucles GxxG (Gutierrez *et al.*, 2005), domaines protéiques impliqués dans la reconnaissance de molécules d'ARN chez les procaryotes et les eucaryotes (Cook *et al.*, 2015; Nicastro *et al.*, 2015; Valverde *et al.*, 2008). La structure tridimensionnelle de la protéine a été déterminée par RMN. Un monomère est composé de 61 acides aminés, 5 feuillets β suivis d'une hélice α et d'une région C-terminal sans structure particulière (Figure 19.A). Les deux monomères s'assemblent de façon inversée au niveau des feuillets formant alors une molécule symétrique composée d'un noyau hydrophobe (formé par les feuillets β) et de deux

extrémités C-terminales (formées par les hélices α et les C-terminal) (Figure 19.B) (Gutierrez *et al.*, 2005).

Une approche comparative a permis de mettre en évidence l'importance de plusieurs résidus des feuillets β_1 , β_5 et de la partie C-terminale dans la reconnaissance des ARNm (Gutierrez *et al.*, 2005; Mercante *et al.*, 2006) (Figure 19.A-Eléments rouges). Plus particulièrement, la proximité tridimensionnelle du feuillet β_1 d'un monomère et du feuillet β_5 de l'autre, constituerait un site fonctionnel d'interaction avec les ARNm (Figure 19.B-Eléments roses) (Mercante *et al.*, 2006). Étant donnée la symétrie du dimère, la protéine CsrA possède deux sites fonctionnels (Mercante *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2007).

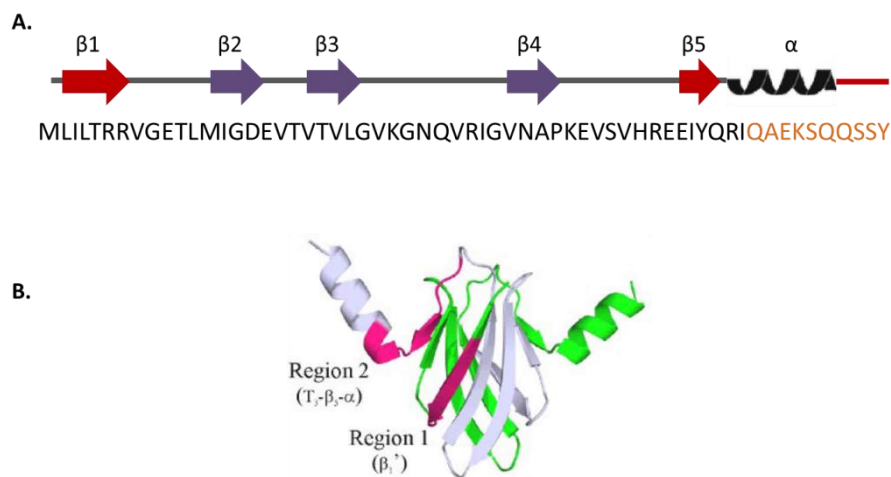


Figure 19 : La protéine CsrA. A. Schéma d'un monomère constitutif de l'homodimère CsrA et sa séquence en acides aminés (Timmermans and Melderer, 2010 ; Timmermans 2010). En rouge sont représentées les régions impliquées dans la reconnaissance de l'ARNm cible par CsrA. En orange sont notés les 10 acides aminés supprimés chez la souche *csrA :kan* B. Représentation tridimensionnelle de l'homodimère CsrA (Mercante *et al.*, 2006). Chaque monomère est représenté par une couleur, blanc ou vert. Un seul des sites actifs de la protéine formé par le rapprochement des feuillets β_1 et β_5 est indiqué: zone rose.

L'interaction entre CsrA et ses ARNm cibles est spécifique et dépend non seulement de la structure de la protéine mais aussi de la structure de l'ARNm. La séquence consensus de fixation de la protéine a été déterminée par la méthode SELEX (« Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment ») (Tuerk and Gold, 1990). Celle-ci est composée d'une douzaine d'acides nucléiques : 5'-RUACARGGAUGU-3' (où R est une purine) (Dubey *et al.*, 2005) et dont la portion GGA est hautement conservée parmi les cibles de CsrA. La structure secondaire de l'ARNm joue également un rôle dans l'affinité de CsrA pour celui-ci. L'affinité

de la protéine est plus importante pour des ARNm dont le motif ARGGA est présent sur la boucle d'une structure tige-boucle (Dubey *et al.*, 2005). D'autre part, les deux sites fonctionnels de CsrA sont capables de se fixer simultanément sur un même messager (Dubey *et al.*, 2005; Mercante *et al.*, 2009). Plus encore, la fixation à un premier site faciliterait l'interaction avec un deuxième site de plus faible affinité. Les distances minimum et optimum entre deux sites de reconnaissance sur un même ARNm ont été calculées à 10 et 18 pb respectivement (Mercante *et al.*, 2009).

La délétion de la protéine CsrA provoque un défaut de croissance sur milieux minimum supplémentés par une source glycolytique (Altier *et al.*, 2000; Timmermans and Van Melder, 2009). La souche *csrA:kan*, souche d'étude du système CSR chez *E. coli*, possède une protéine CsrA dont les 10 derniers acides aminés ont été supprimés par insertion du transposon kanamycine au niveau du 51^{ème} codon (Romeo and Gong, 1993). Ceci a pour conséquence de supprimer la partie C-Terminal impliquée dans la reconnaissance des ARNm (Figure 19.A) et de diminuer l'activité de la protéine.

IV.A.2. Les ARN non codants CsrB et CsrC

Suite à la découverte de CsrA, d'autres éléments composant le système CSR ont été mis en évidence par co-purification avec une protéine recombinante CsrA-His tagged ou lors de la recherche de facteurs impliqués dans la synthèse de glycogène. Deux ARNnc, CsrB et CsrC, de tailles respectives 366 nucléotides et 245 nucléotides sont capables de séquestrer la protéine CsrA (Gudapaty *et al.*, 2001; Liu and Romeo, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003). Ceci est rendu possible par la présence de séquences nucléotidiques répétées contenant le motif ARGGA sur des structures tige-boucle. Ainsi CsrB possède 22 sites de fixation de CsrA (Liu and Romeo, 1997) et peut séquestrer jusqu'à 9 dimères alors que CsrC possède 13 sites de fixation (Weilbacher *et al.*, 2003). Il est intéressant de constater que ces ARNnc ne sont pas liés génétiquement et qu'en cas de délétion de l'un, la transcription de l'autre n'est que faiblement augmentée (Weilbacher *et al.*, 2003).

Une approche par ARN « gel retard » a permis de déterminer les constantes d'affinités de CsrA pour CsrB et CsrC. L'affinité pour CsrB ($K_d = 0,8 \text{ nM}$) est 10 fois plus forte que pour

CsrC (Kd=8nM) (Weilbacher *et al.*, 2003). D'autre part, la protéine CsrA n'influe pas sur la stabilité de ces ARNnc (Gudapaty *et al.*, 2001; Weilbacher *et al.*, 2003). Dans des cellules en croissance, 30% des molécules de CsrA sont estimées être séquestrées par CsrB et beaucoup moins par CsrC.

Ce système de régulation par séquestration permet une modulation rapide et fine de la disponibilité en CsrA et par conséquent, une régulation rapide des fonctions régulées par CsrA (Adamson and Lim, 2013).

IV.A.3. La protéine CsrD

La protéine CsrD est impliquée dans le turnover des ARNnc CsrB et CsrC (Suzuki *et al.*, 2006) (Figure 20). CsrD est une protéine membranaire contenant un domaine GGDEF et un domaine EAL caractéristiques des protéines du métabolisme du c-di-GMP (guanosine monophosphate bis-(3'-5')-cyclique-dimérique) (Schmidt *et al.*, 2005).

Cette protéine entraîne la dégradation des deux ARNnc selon un mécanisme RNase E dépendant. Un mutant délété du gène *csrD* présente un niveau d'expression et une quantité intracellulaire de CsrA inchangés, mais une forte diminution de l'activité de la protéine dû à l'accumulation de CsrB et CsrC dans la cellule. Différentes approches ont permis de montrer que CsrD n'agit pas en tant que ribonucléase et que les domaines GGDEF et EAL sont essentiels à son activité. Le mécanisme d'action le plus probable (discuté dans Suzuki *et al.*, 2006) est la fixation de CsrD à ces deux ARNnc qui entraînerait alors une modification tridimensionnelle des ARNnc les rendant accessibles à la RNase E. A l'heure actuelle, aucun autre ARN cible de CsrD n'a été déterminé alors que l'implication de cette protéine dans l'activation, du facteur de transcription CsgD a été soulignée (Sommerfeldt *et al.*, 2009) .

Alors que CsrD régule indirectement l'activité de la protéine CsrA, cette dernière régule indirectement la transcription du gène *csrD* (Jonas *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2006) (Figure 20).

IV.A.4. Le système à double composante BarA/UvrY

Le système à double composante BarA/UvrY constitue le dernier élément du système CSR (Suzuki *et al.*, 2002). Ce système est composé de la protéine kinase membranaire BarA et

de la protéine régulatrice associée UvrY (Pernestig *et al.*, 2001) (Figure 20). Suite à sa phosphorylation liée à la probable détection dans l'environnement de molécules telles que du formate, de l'acétate ou de courts acides gras (Gonzalez Chavez *et al.*, 2010), BarA catalyse la phosphorylation de UvrY. Ainsi activée, UvrY entraîne la transcription des ARNnc CsrB et CsrC en se fixant au niveau de leur promoteur (Martínez *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2002). Ceci aboutit à l'augmentation de la séquestration de la protéine CsrA. La phosphorylation d'UvrY peut également être indépendante de BarA, le phosphate provenant alors de l'acétylphosphate, mais l'implication physiologique de cette activation est encore peu connue (Klein *et al.*, 2007; McCleary and Stock, 1994; Tomenius *et al.*, 2005)

L'activité du système à double composante BarA/UvrY est dépendante de CsrA (Camacho *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2002). En effet, chez un mutant *csrA:kan*, l'activation de la transcription de *csrB* dépendante de UvrY n'a pas lieu (Suzuki *et al.*, 2002). CsrA régule l'activité de ce système indirectement et de deux façons différentes. D'une part, CsrA active indirectement l'expression d'*uvrY* aux niveaux transcriptionnels et post-transcriptionnels (Figure 20). D'autre part, CsrA est nécessaire au changement d'activité de BarA d'un état de phosphatase à celui de kinase (Camacho *et al.*, 2014).

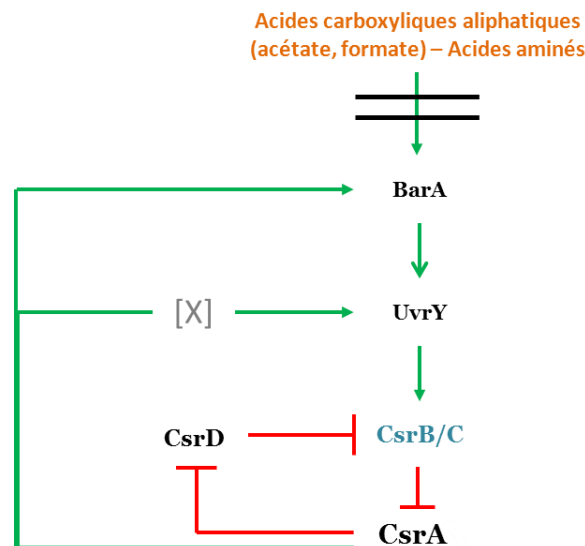


Figure 20 : Fonctionnement du système CSR. (d'après(Seyll and Van Melderren, 2013)). **Flèches :** Rouge = inhibition, Vert = activation – **Éléments :** Noir = protéine, bleu = ARNnc, jaune = molécules activant BarA, [X] = molécule inconnue. Le système BarA/UvrY, activé par des facteurs environnementaux active la transcription des ARNnc CsrB et CsrC capable d'inhiber CsrA. Ces ARNnc sont dégradés en présence de CsrD. Une première boucle de rétrocontrôle est effectuée par CsrA sur la synthèse de CsrD. Une deuxième boucle de rétrocontrôle est effectuée indirectement par CsrA via l'activation du système BarA/UvrY.

IV.B. Mécanismes de régulation par le système CSR chez *Escherichia coli*

Au travers de l'activité de la protéine CsrA, le système CSR régule la traduction et la stabilité d'ARNm cibles. Parmi les cibles avérées de CsrA, la majorité des régulations est négative mais il existe deux exemples de régulation positive. Dans cette partie, les différents mécanismes de régulations par CsrA sont présentés.

IV.B.1. Mécanismes de régulation négative

La majorité des cas démontrés de régulation post-transcriptionnelle directe par CsrA est une régulation négative où CsrA inhibe la traduction de ses cibles et/ou diminue leur stabilité (Liu *et al.*, 1995). Une telle régulation a été démontrée et caractérisée pour 5 transcrits chez *E.coli* : ceux des gènes *glgC*, *hfq*, *csrA*, *sdiA* et celui de l'opéron *pgABCD* (Baker *et al.*, 2002, 2007; Dubey *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Romeo *et al.*, 1993a; Wang *et al.*, 2005; Yakhnin *et al.*, 2011a, 2011b; Yang *et al.*, 1996).

Le mécanisme réactionnel de régulation négative a été étudié pour la régulation négative du gène *glgC* impliqué dans la synthèse de glycogène (Baker *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1995; Mercante *et al.*, 2009). Dans la partie 5' non traduite, l'ARNm de *glgC* comporte quatre sites d'interaction avec CsrA (Baker *et al.*, 2002). Deux de ces sites sont impliqués dans la fixation de CsrA : le premier, situé en amont de la séquence de Shine-Dalgarno (SD) présente une forte affinité pour CsrA (Baker *et al.*, 2002), et un deuxième superposé à la séquence SD présente une affinité plus faible. Le mécanisme révélé par Mercante *et al.*, (2009) se déroule en dynamique, en deux étapes (Figure 21.A) : (i) 1^{ère} fixation de CsrA sur l'ARNm au niveau du premier site de fixation, (ii) 2^{ème} fixation de CsrA sur le deuxième site de fixation. CsrA fixée au niveau de la séquence SD empêche la fixation du ribosome et inhibe la traduction (Baker *et al.*, 2002; Mercante *et al.*, 2009).

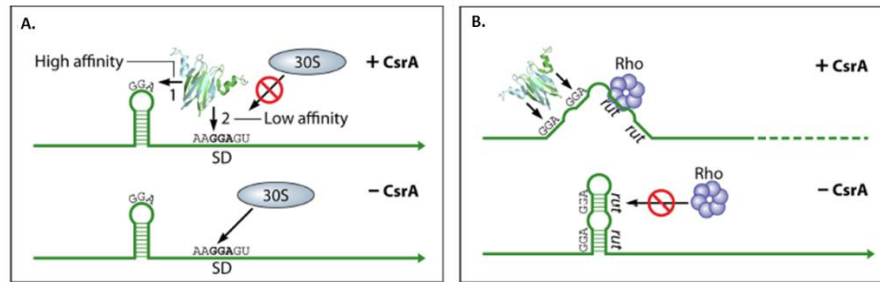


Figure 21 : Mécanismes de régulation négative par la protéine CsrA (d'après (Vakulskas *et al.*, 2015)). **A. Inhibition de la traduction par compétition avec le ribosome** (cas de la régulation de *glgC*). En présence de CsrA (+CsrA), la protéine se fixe sur deux sites de reconnaissance de plus ou moins faible affinité. La fixation entraîne la séquestration de la séquence SD et empêche la fixation du ribosome. En l'absence de CsrA (-CsrA), la traduction se déroule normalement. **B Inhibition post-transcriptionnelle par activation de la terminaison Rho-dépendante de la transcription** (cas de *pgaA*). En présence de CsrA (+CsrA), la protéine se fixe sur l'ARN en cours de transcription et empêche la formation d'une structure tige-boucle ce qui favorise la fixation du facteur de terminaison Rho et provoque un arrêt prématuré de la transcription. En l'absence de CsrA (-CsrA), la boucle se forme et le facteur Rho ne peut pas se fixer.

Le même mécanisme entre en jeu dans la plupart des régulations négatives par CsrA (Baker *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005; Yakhnin *et al.*, 2011a).

Un mécanisme différent a été déterminé pour le gène *pgaA* (Figure 21.B) : la fixation de la protéine CsrA sur l'ARN en cours de transcription entraîne une modification de sa structure et favorise la fixation du facteur de terminaison Rho et l'arrêt prématuré de la transcription (Wang *et al.*, 2005).

Dans la plupart des cas, l'inhibition de la traduction s'accompagne d'une diminution de la stabilité de l'ARNm (Babitzke and Romeo, 2007). En effet, dans un mutant *csrA :kan* le temps de demi-vie de l'ARNm *glgC* augmente de 4min par rapport à sa valeur initiale (Liu *et al.*, 1995). Cependant, les mécanismes sont encore inconnus. L'hypothèse avancée est qu'en l'absence de ribosomes sur l'ARNm, celui-ci est dégradé (Baker *et al.*, 2002).

IV.B.2. Mécanismes de régulation positive

Plusieurs travaux indiquent une régulation positive de CsrA sur l'expression de certains gènes (McKee *et al.*, 2012; Sabnis *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000a, 2001). Cependant, la nature directe ou indirecte de la régulation n'est pas toujours claire. Seulement deux exemples de régulation positive directe par la protéine ont été démontrés à ce jour (Patterson-Fortin *et al.*, 2013; Yakhnin *et al.*, 2013).

CsrA régule positivement la mobilité de la cellule via la stabilisation de *flhDC*, régulateur principal de la synthèse du flagelle (Wei *et al.*, 2001). CsrA se fixe en deux endroits sur l'extrémité 5' de l'ARNm, au niveau de deux sites de reconnaissance situés sur deux épingles à cheveux à trente nucléotides d'intervalle (Yakhnin *et al.*, 2013). Ainsi fixée, la protéine empêche la reconnaissance de l'extrémité 5' mono-phosphorylée de l'ARNm par la RNase E (Figure 22.A). CsrA permet donc la stabilisation de l'ARNm de *flhDC* en le protégeant de la dégradation par le dégradosome (Yakhnin *et al.*, 2013).

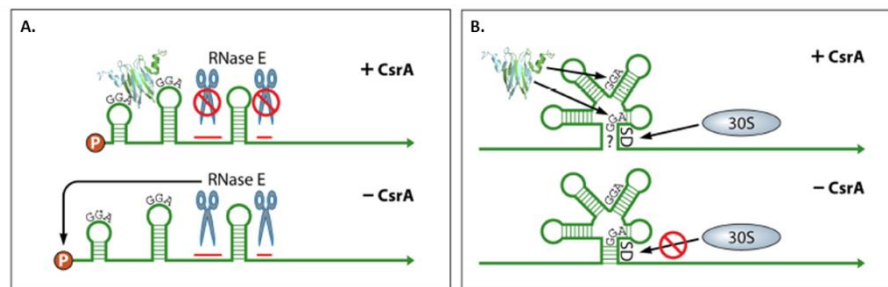


Figure 22 : Mécanismes de régulation négative par la protéine CsrA (d'après (Vakulskas *et al.*, 2015)). **A. Mécanisme de stabilisation de *flhDC*.** En présence de CsrA (+CsrA), la protéine se fixe sur deux sites de reconnaissance empêchant la reconnaissance de l'extrémité 5' phosphorylée par la RNaseE. En l'absence de CsrA (-CsrA), la RNase E dégrade l'ARNm. **B. Activation de la traduction de *moaA* par fixation au riboswitch.** En présence de CsrA (+CsrA), la protéine se fixe au niveau du riboswitch ce qui a pour conséquence de rendre la séquence SD accessible aux ribosomes. En l'absence de CsrA (-CsrA), la séquence SD reste séquestrée dans le riboswitch.

CsrA active l'expression du gène *moaA*, impliqué dans le métabolisme du molybdate (Patterson-Fortin *et al.*, 2013). Deux sites d'interaction se trouvent sur la séquence 5' non traduite au niveau d'un riboswitch. La fixation de CsrA sur ce riboswitch induit une modification structurale de l'ARNm et libère la séquence SD sur laquelle le ribosome peut alors se fixer (Figure 22.B) (Patterson-Fortin *et al.*, 2013).

Ces deux exemples de régulation positive démontrent que CsrA régule au niveau post-transcriptionnel et positivement l'expression de gènes en augmentant la stabilité de certains ARNm ou en activant leur traduction.

IV.C. Les ARNm cibles du système CSR et phénomènes physiologiques régulés

IV.C.1. ARNm cibles de CsrA

Alors que les mécanismes moléculaires de régulation de l'expression génique par CsrA ont été déterminés pour une dizaine de cibles, il existe d'autres cibles supposées de CsrA pour lesquelles un effet de la protéine CsrA sur leur stabilité et/ou sur leur traduction a été mis en évidence mais dont le mécanisme est indéterminé. Cela amène le nombre de gènes régulés par CSR à 31 chez *E. coli*, répartis parmi plusieurs fonctions cellulaires (Figure 23).

Fonction	Cible	Régulation	Mécanisme ^a	Critères ^b	Références ^c
Glycogénèse	glgC	Négative	a,b	A - F	1, 2, 3, 4
	glgA	Négative	d	C	4
	glgB	Négative	d	C	1
	glgS	Négative	d	C	4
	pgm	Négative	d	F	5
Catabolisme du glycogène	glgP	Négative	d	C - F	4
	malP	Négative	d	F	4
Glycolyse	pgi	Positive	d	F	5
	pfkA	Positive	d	F	5
	tpiA	Positive	d	F	5
	eno	Positive	d	F	5
	pykF	Positive	d	F	5
Shunt glyoxylique	aceA	Négative ou Positive	d	F	6, 7, 8
	aceB	Positive	d	F	6
Métabolisme de l'acétate	acs	Positive	d	C, F	7
Gluconéogenèse	pckA	Positive	d	C, F	1
	fbp	Positive	d	F	5
	pps	Positive	d	F	5
Biofilms	pgaABCD	Négative	a,b	A - E	9
Régulateur biofilms	nahR	Négative	d	A - F	10
Régulateur mobilité	flhDC	Positive	c	A - D, F	11, 12
Métabolisme c-di-GMP	ydeH	Négative	d	(A), B, D	13
	ycdT	Négative	d	(A), B, D	13
Pathogénicité	sepL	Positive	d	B, D	14
	espABD	Positive	d	B, D	14
Régulateur post-transcriptionnel	hfq	Négative	a	A, B, D - F	15
	csrA	Négative	a	C - F	16
Réponse stringente	relA	Négative	d	B - D, F	17
Quorum sensing	sdiA	Négative	a,b	C - F	18
Transport peptidique	cstA	Négative	a,b	C - E	19
Synthèse du cofacteur du molybdène	moaA	Positive	d	B - D	20

Figure 23 : Récapitulatif des cibles directes et indirectes de CsrA chez *Escherichia coli*

^a. a : Inhibition de la traduction/Compétition avec la fixation du ribosome ; b : Diminution de la stabilité de l'ARNm ; c : stabilisation de l'ARNm/Protection de la dégradation par la RNaseE ; d : inconnu

^b. A : Mesure de la stabilité ; B : dosage de l'ARNm (Northern Blot, RT-qPCR, puce) ; C : fusion transcriptionnelle et/ou traductionnelle avec LacZ ; D : Interaction de la protéine avec le transcrite ; E : Compétition de CsrA avec le ribosome ; F : Mesure d'activité/dosage protéique.

^c. (1) Romeo *et al.*, 1993 ; (2) Liu *et al.*, 1995 ; (3) Baker *et al.*, 2002 ; (4) Yang *et al.*, 1996 ; (5) Sabnis *et al.*, 1995 ; (6) Romeo *et al.*, 1998 ; (7) Wei *et al.*, 2000 ; (8) Chang *et al.*, 2012 ; (9) Wang *et al.*, 2005 ; (10) Pannuri *et al.*, 2012 ; (11) Wei *et al.*, 2001 ; (12) Yakhnin *et al.*, 2013 ; (13) Jonas *et al.*, 2009 ; (14) Bhatt *et al.*, 2009 ; (15) Baker *et al.*, 2007 ; (16) Yakhnin *et al.*, 2011a ; (17) Edwards *et al.*, 2011 ; (18) Yakhnin *et al.*, 2011b ; (19) Dubey *et al.*, 2003 ; (20) Patterson-Fortin *et al.*, 2013

Bleu : Fonctions du métabolisme, Vert : fonctions du comportement de groupe, Orange : fonctions de la pathogénicité. Blanc : autres fonctions.

Ainsi le système CSR est impliqué dans la régulation de grandes fonctions physiologiques telles que le métabolisme, la réponse stringente, la régulation de la mobilité et des biofilms ou encore la pathogénicité. Cette protéine est également impliquée dans la régulation de son propre transcrite ainsi que dans celle d'un deuxième régulateur post-transcriptionnel : la protéine Hfq. Les cibles ont été déterminées à partir de différentes techniques expérimentales. Pour la plupart des cibles dont le mécanisme moléculaire est inconnu, les auteurs se sont basés sur des fusions transcriptionnelles/traductionnelles et/ou sur la mesure d'activités enzymatiques dans un mutant *csrA*.

Récemment, au sein de l'équipe EAD4 du LISBP, une analyse de stabilome menée en chémostat sur glucose a mis en évidence que la stabilité de 450 ARNm est modifiée chez la souche *csrA51*, souche équivalente de la souche *csrA:kan* (Esquerre et al., (soumis)).

IV.C.2. Fonctions cellulaires régulées par le système CSR

i. Régulation de comportement de groupe

Parmi les différents phénomènes physiologiques sous le contrôle de CSR se trouve le comportement de groupe. Ceci comprend les différents phénomènes impliquant la synchronisation de comportements de l'ensemble des cellules tels que la formation de biofilms et la mobilité, ainsi que les mécanismes de communication entre les bactéries appelés quorum sensing.

Le quorum sensing permet aux bactéries d'évaluer la taille de leur population ou des populations environnantes et de coordonner leur comportement (Waters and Bassler, 2005). Chez les bactéries à Gram-négatives, les lactones homosérines (AHL) sont le signal moléculaire le plus fréquent. Même si, *E. coli* ne produit pas d'AHL (Van Houte and Jansen, 1970), elle possède un récepteur SdiA spécifique lui permettant de percevoir les AHL synthétisées par les bactéries environnantes (van Houte and Jansen, 1970; Smith *et al.*, 2010). CsrA régule négativement le quorum sensing en inhibant la traduction de l'ARNm *sdiA* (Yakhnin *et al.*, 2011a) (Figure 23).

Dans certaines conditions environnementales, les cellules peuvent former des biofilms. Ces structures nécessitent la coordination de toutes les cellules (pour review :

(Moons *et al.*, 2009)). La première étape de formation d'un biofilm consiste en l'adhésion des cellules à un substrat à l'aide de différents facteurs cellulaires tels que l'homopolymère linéaire poly- β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine (PGA) (Wang *et al.*, 2004). L'opéron principal de la synthèse de PGA est l'opéron *pgaABCD* qui comporte six sites de reconnaissance par la protéine CsrA dans la partie 5' non traduite de l'ARNm. De plus, CsrA inhibe la traduction de la protéine NhaR, facteur de transcription activant la transcription de l'opéron *pgaABCD* (Edwards *et al.*, 2011; Pannuri *et al.*, 2012; Romeo *et al.*, 2013). Ainsi CsrA inhibe de deux façons la formation de biofilm chez *E. coli* (Wang *et al.*, 2005) (Figure 23). A l'inverse, les bactéries *E. coli* sont capables de se mouvoir à l'aide d'un flagelle. La synthèse du flagelle est sous le contrôle du régulateur FlhDC lui-même stabilisé par la protéine CsrA (Wei *et al.*, 2001; Yakhnin *et al.*, 2013, 2011b) (Figure 23). Une protéine CsrA fonctionnelle est de plus essentielle à la synthèse du flagelle, entièrement absent chez la souche *csrA:kan*. D'un point de vue métabolique, certains métabolites intracellulaires peuvent également influencer sur l'état sessile ou mobile de la cellule. Par exemple, une forte concentration de c-di-GMP favorise l'état sessile et inversement (Jonas *et al.*, 2010). L'expression de deux enzymes, YcdT et YdeH, impliquées dans la synthèse de c-di-GMP est sous un contrôle négatif de la protéine CsrA (Jonas *et al.*, 2008) (Figure 23).

Le système CSR régule ainsi deux phénomènes antagonistes de façon opposée en favorisant la mobilité et en inhibant la sédentarité sous forme de biofilm et ce, en régulant à la fois les effecteurs et les régulateurs de ces phénomènes physiologiques.

ii. Régulation de la virulence chez les souches E. coli pathogènes

Les souches d'*E. coli* entéropathogéniques (EPEC et EHEC) sont capables, en fonction des conditions environnementales, de devenir virulentes (Kaper *et al.*, 2004). Ces bactéries se fixent aux cellules de l'hôte via un mécanisme complexe engendrant la déformation de la cellule hôte et la formation d'un piédestal qui permet l'ancrage de la bactérie à la cellule hôte et la sécrétion de molécules bactériennes (Figure 24). Dans un premier temps, les bactéries sécrètent différents effecteurs impliqués dans l'amarrage de la bactérie sur la cellule hôte : SepL, EspA, EspB, EspD via un système de sécrétion de type III. Puis, l'insertion de récepteur d'intimine (Tir) dans la membrane de la cellule hôte ainsi que la production d'intimine

permettent la stabilisation de la cellule pathogène à la cellule hôte et la formation du piédestal (Figure 24). Ainsi, la bactérie produit directement un panel de protéines dans la cellule de l'hôte afin d'utiliser ses voies métaboliques (Croxen and Finlay, 2010).

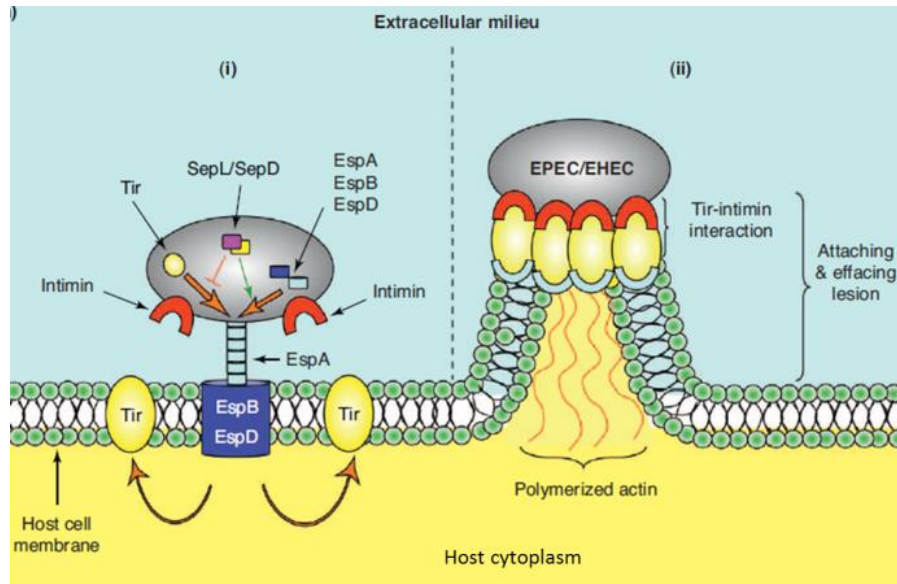


Figure 24 : Formation du piédestal par les bactéries EPEC ou EHEC. Après la synthèse et la sécrétion des effecteurs, les bactéries s'amarrent à la cellule ce qui aboutit à la formation d'un piédestal. (Bhatt *et al.*, 2011).

Cinq opérons polycistroniques regroupés sous la forme d'un îlot génétique gouvernent la pathogénicité des *E. coli* entéropathogéniques. Ils incluent la synthèse du système de sécrétion de type III et les différents effecteurs (Moon *et al.*, 1983). Chez une souche EPEC *csrA:kan*, le nombre de piédestaux observés est fortement diminué. CsrA régule positivement l'expression des deux opérons *sepL* et *espADB* (Bhatt *et al.*, 2009) (Figure 23). Ceci indique un effet positif de CsrA sur la mise en place de la pathogénicité chez ces souches (Bhatt *et al.*, 2009). Un effet négatif de CsrA sur l'expression de GrlA, activateur principal de l'îlot génétique a également été mis en évidence (Romeo *et al.*, 2013a). Ainsi, CsrA agit à la fois comme un activateur et un inhibiteur de la pathogénicité. Cependant une surexpression de CsrA tend plutôt vers une diminution de la pathogénicité (Romeo *et al.*, 2013).

iii. Régulation du métabolisme

La régulation post-transcriptionnelle par CSR est venue s'ajouter en 1993 aux nombreuses régulations déjà mises en évidence pour le métabolisme (Romeo *et al.*, 1993a; Sabnis *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000a). Des travaux menés par Edwards et son équipe ont mis

permis de déterminer tous les transcrits co-purifiés avec la protéine CsrA lors de croissances exponentielles (Edwards *et al.*, 2011). Parmi les 721 ARNm détectés, 61 appartiennent au métabolisme des glucides, 13 au métabolisme des acides nucléiques, 61 au métabolisme des acides aminés et 19 au métabolisme des lipides (Edwards *et al.*, 2011) soulignant ainsi un effet du système CSR dans la régulation du métabolisme en général.

Comme expliqué précédemment, le système CSR inhibe la synthèse de glycogène en inhibant et déstabilisant l'opéron *glgCAP* codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse du glycogène (Romeo *et al.*, 1993a; Yang *et al.*, 1996) (Figures 23 et 25). CSR impacte également négativement l'activité enzymatique de la phosphoglucomutase (Pgm), première enzyme de la voie (Sabnis *et al.*, 1995). Tout comme sa synthèse, la dégradation du glycogène fait l'objet d'une régulation négative par CsrA. En effet, des fusions transcriptionnelles/traductionnelles ainsi que des mesures d'activités enzymatiques ont montré une régulation négative de l'expression des gènes *glgP* et *malP* par la protéine CsrA (Yang *et al.*, 1996) (Figure 23).

Concernant le MCC, l'activité et/ou les niveaux de transcrits des enzymes gluconéogéniques PEP-carboxykinase (Pck), PEP-synthetase (Pps) et Fructose-1,6 biphosphatase (Fbp) sont diminués en présence de la protéine CsrA (Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995) (Figures 23 et 25). Inversement, le système CSR semble avoir un effet positif sur la glycolyse. En effet, les activités enzymatiques de certaines enzymes de la glycolyse sont diminuées en l'absence de CsrA (Sabnis *et al.*, 1995) (Figures 23 et 25). De plus, un mutant de surexpression de *csrB*, équivalent à une inhibition de l'activité de CsrA, présente un métabolisme glycolytique diminué, avec l'absence de produit de fermentation tel que l'acétate (McKee *et al.*, 2012). Dès lors, le système CSR apparaît comme un régulateur de deux métabolismes antagonistes (Figure 25). Pernestig *et al.* (2003) suggèrent même son implication dans la transition métabolique d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme gluconéogénique. Alors qu'aucune régulation n'a été mise en évidence concernant le cycle de Krebs ou la voie des pentoses phosphates, l'acétyl-coenzymeA synthétase (Acs), catalysant la consommation d'acétate extracellulaire à faible concentration (Kumari *et al.*, 1995), serait activée par la protéine CsrA (Wei *et al.*, 2000). Des résultats contradictoires concernant l'effet

de CsrA sur la première enzyme du cycle du glyoxylate, l'isocitrate lyase (Icl), soulignent une régulation probable par CsrA mais qui reste encore à clarifier (Chang *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2000).

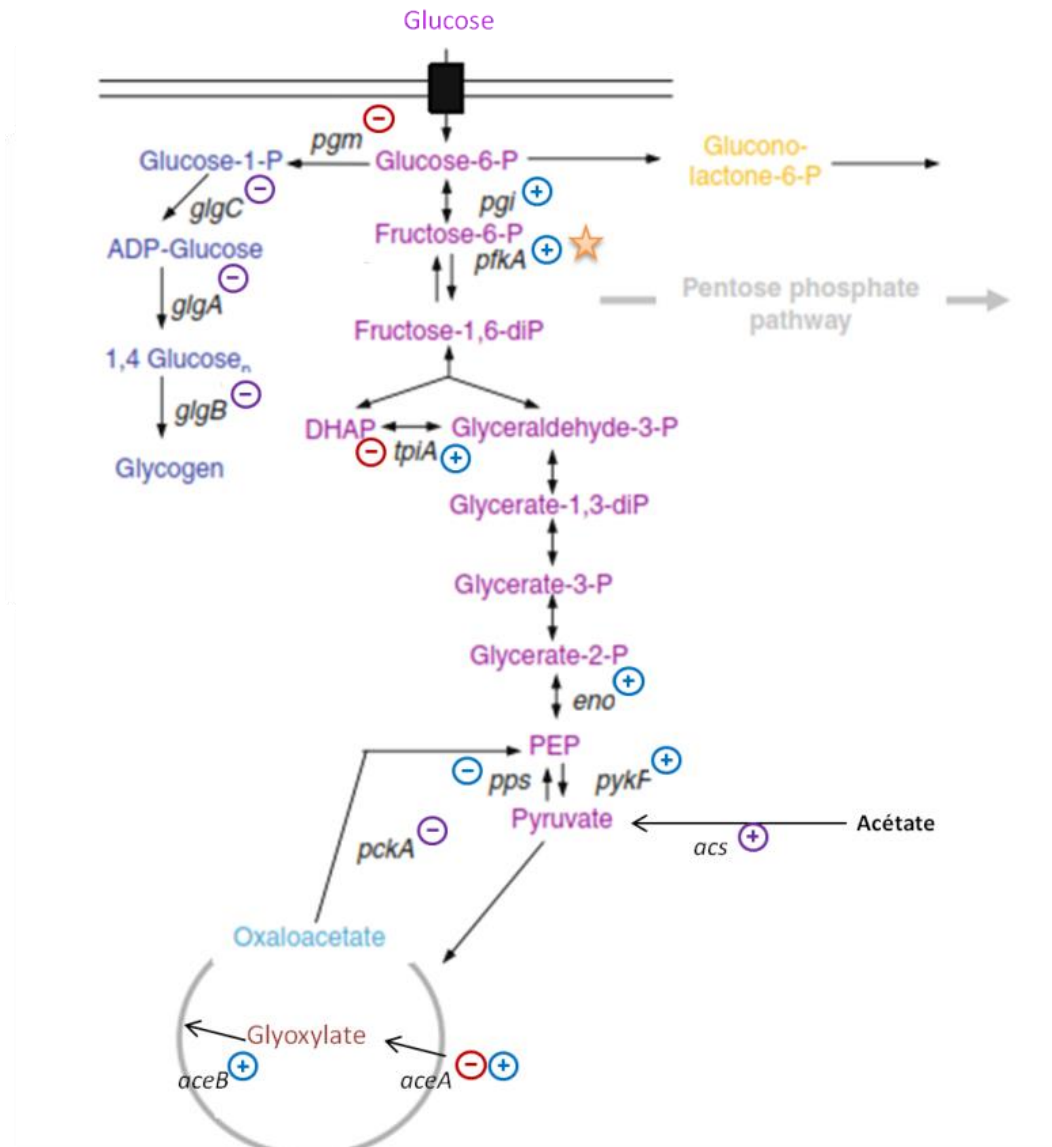


Figure 25 : Régulations du métabolisme carboné central et de la synthèse de glycogène par CsrA (Chang *et al.*, 2013; McKee *et al.*, 2012; Revelles *et al.*, 2013; Romeo, 1998; Romeo *et al.*, 1993a; Sabnis *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996). **Mesures** : Bleu: Activités enzymatiques spécifiques, Violet: Fusion transcriptionnelles et/ou traductionnelles avec LacZ, Rouge: données de protéomiques, Etoile: Flux

IV.D. Les régulations du système CSR

L'activité du système CSR est finement régulée afin de synchroniser les régulations effectuées par CSR avec les besoins adaptatifs de la cellule. La sous-partie IV.A a mis en

évidence la régulation de l'activité de la protéine par les autres composantes du système. Cependant ces mécanismes de régulation sont intégrés dans un réseau plus complexe incluant notamment des régulations réciproques avec d'autres régulateurs globaux. Un schéma récapitulatif est présenté en Figure 26.

IV.D.1. Régulations de CsrA

La description précédente des différents éléments du système CSR a montré l'importance des ARNnc CsrB et CsrC dans la régulation de l'activité de la protéine. Il existe également un troisième ARNnc, McaS, indépendant du système CSR, capable de séquestrer et d'inhiber la protéine CsrA par la présence de 4 sites de fixation (Jørgensen *et al.*, 2013) (Figure 26).

D'autre part, l'expression de la protéine est soumise à plusieurs régulations. Cinq promoteurs (P1, P2, P3, P4 et P5) contrôlent l'expression de *csrA* (Yakhnin *et al.*, 2011b). Alors que P1 et P2 ont une faible affinité avec l'ARNpol et sont respectivement σ^S et σ^{70} dépendants, P3 est un promoteur fort (forte affinité avec l'ARNpol) σ^S dépendant. L'importante dépendance des promoteurs au facteur σ^S expliquerait l'accumulation de CsrA observée à l'entrée en phase stationnaire (Gudapaty *et al.*, 2001). CsrA active indirectement sa propre transcription (Yakhnin *et al.*, 2011b). Cependant le mécanisme n'est pas éludé à ce jour. L'hypothèse la plus probable serait que CsrA active un activateur ou réprime un répresseur qui régulerait directement P3 (Yakhnin *et al.*, 2011b).

CsrA régule son expression non seulement au niveau transcriptionnel mais aussi au niveau post-transcriptionnel. En effet, l'ARNm de *csrA* possède 4 sites d'interaction avec la protéine CsrA (Edwards *et al.*, 2011a; Yakhnin *et al.*, 2011b). CsrA inhibe sa propre traduction selon le même mécanisme de répression que celui décrit au paragraphe IV.B.1.

IV.D.2. Régulation des ARNnc CsrB et CsrC

Alors que UvrY active la transcription des deux ARNnc CsrB et CsrC, les niveaux de ces deux ARNnc dépendent fortement de la richesse du milieu en nutriments : plus le milieu est riche (ex : LB, présence d'acides aminés) moins les ARNnc sont exprimés et inversement (Jonas and Melefors, 2009). De la même façon, une accumulation de ces deux ARNnc est observée

en fin de croissance, lorsque le milieu est très pauvre en nutriments (Gudapaty *et al.*, 2001). Il est probable que ceci soit lié à l'activation de BarA par les composés tels que l'acétate, le formate ou encore le propionate (Gonzalez Chavez *et al.*, 2010).

Vakulskas *et al.*, ont également démontré l'implication de deux DEAD ARN hélicases, DeaD et SrmB dans l'activation de l'expression des deux ARNnc CsrB et CsrC lors d'une phase exponentielle de croissance (Vakulskas *et al.*, 2014). Le mécanisme d'action de SrmB demeure non déterminé mais celui de DeaD est supposé réguler indirectement l'expression CsrB et CsrC en promouvant la traduction d'*uvrY* (Vakulskas *et al.*, 2014).

IV.D.3. Inter-régulations avec d'autres systèmes de régulations

La régulation du système CSR implique l'action de régulateurs globaux occupant un rôle fondamental dans la coordination des phénomènes cellulaires : la molécule (p)ppGpp et la protéine Hfq. Les interactions avec ces régulateurs sont réciproques : CSR régule également l'activité de ces régulateurs. L'implication de CSR dans la régulation de tels régulateurs augmente indirectement mais considérablement le nombre de ces cibles.

Comme expliqué dans la figure 23, CSR régule directement la traduction de la protéine Hfq en se fixant sur un unique site de reconnaissance situé au niveau de la séquence Shine Dalgarno (Baker *et al.*, 2007). La transcription de *hfq* semble également être indirectement réprimée par CsrA (Baker *et al.*, 2007). Par contre, Hfq régule l'expression de deux des trois ARNnc régulateurs de CsrA (Figure 26). D'une part, Hfq participe à la stabilisation de McaS (Thomason *et al.*, 2012), d'autre part, elle participe indirectement et via un mécanisme encore inconnu à l'activation de la transcription de CsrB (Suzuki *et al.*, 2006) (Figure 26).

Un lien étroit a été identifié entre le système CSR et la réponse stringente (Edwards *et al.*, 2011). En effet CsrA a été co-purifiée avec les trois protéines associées à la synthèse et l'activité de (p)ppGpp : les protéines RelA et SpoT responsables de sa synthèse, et la protéine DksA, co-facteur de son activité (Edwards *et al.*, 2011). CsrA régule négativement la synthèse de la protéine RelA et donc indirectement la synthèse de (p)ppGpp et de fait, inhibe la réponse stringente. D'autre part, (p)ppGpp active la synthèse des ARNnc CsrB et CsrC exerçant ainsi un contrôle négatif sur l'activité de CsrA (Figure 26). Ces co-régulations concourent

probablement à l'optimisation de la mise en place de la phase stationnaire. L'augmentation de (p)ppGpp provoquée par la carence, active la production des ARNnc CsrB et CsrC et réprime l'activité de CsrA qui pourrait contrecarrer l'effet de (p)ppGpp. En effet, (p)ppGpp et CsrA régulent de façon opposée certaines cibles communes comme l'opéron *glgCAP* et le régulateur FlhDC (Lemke *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2001; Yakhnin *et al.*, 2013). Plus de 40% des gènes co-purifiés avec la protéine CsrA font également l'objet d'une régulation par (p)ppGpp (Aberg *et al.*, 2009; Edwards *et al.*, 2011). Cependant, il est impossible d'affirmer que toutes les cibles communes à CsrA et (p)ppGpp sont régulées de façon contraire par ces deux régulateurs.

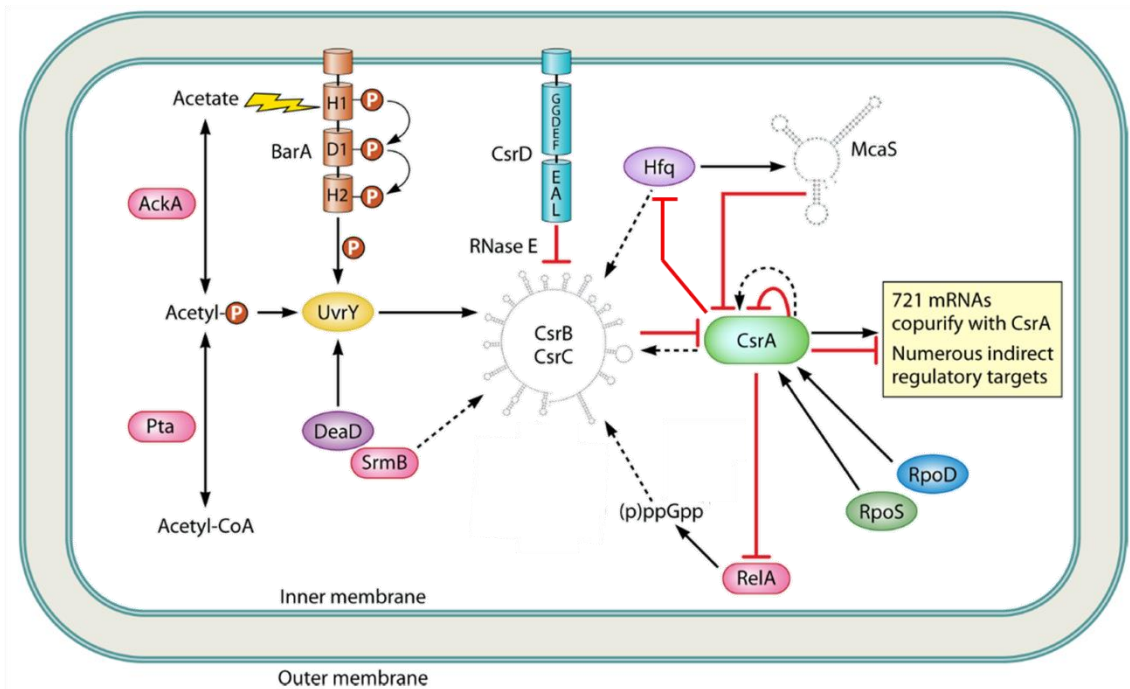


Figure 26 : Réseau de régulation du système CSR. Les traits pleins correspondent à des mécanismes mis en évidence expérimentalement, alors que les pointillés correspondent à des régulations dont le mécanisme est encore inconnu. Les régulations positives et négatives sont représentées par des flèches noires et des barres en T rouges respectivement. P correspond à un groupement phosphate. (Vakulskas *et al.*, 2015)

Le système CSR constitue à lui seul un système de régulation complexe impliqué dans la régulation de nombreux phénomènes dont le métabolisme carboné central, d'une part par sa régulation de certains gènes du métabolisme et d'autre part par son interaction avec des régulateurs du MCC. Son intégration au réseau de régulation du MCC contribue à augmenter la difficulté d'analyse du MCC.

V. Stratégie d'analyse de l'adaptation du MCC

L'étude du MCC et de son adaptation requiert l'intégration de toutes les informations allant de l'expression des gènes au phénotype. La taille et la diversité des réseaux à intégrer, ainsi que leurs régulations et leurs interactions constituent un ensemble trop complexe pour appréhender le MCC simplement et dans son intégralité. A cela s'ajoute la notion de dynamique et donc la dimension temporelle du phénomène étudié

Une approche de biologie des systèmes, qui a pour objectif de définir les liens entre différents événements moléculaires et un phénotype observé, permet d'aborder une telle question biologique (Kitano, 2002a). Cette approche associe notamment l'utilisation de larges jeux de données de type « -omiques » et leur intégration par l'utilisation de modèles mathématiques (Kitano, 2002b) (Figure 27). Les données issues du transcriptome, protéome et du métabolome fournissent les concentrations des différents éléments du réseau comme les ARNm, les protéines et les métabolites. Les approches de fluxomique permettent d'obtenir les valeurs de flux au sein du réseau. L'intégration mathématique de ces données permet de comprendre le fonctionnement du système et les interactions mises en jeux lors de son évolution dans le temps (Heinemann and Sauer, 2010).

Dans cette partie, différentes méthodes d'acquisition de données « -omiques » utilisées durant ces travaux de thèse et permettant d'étudier le MCC et ses régulations ainsi que différentes approches d'intégration sont présentées.

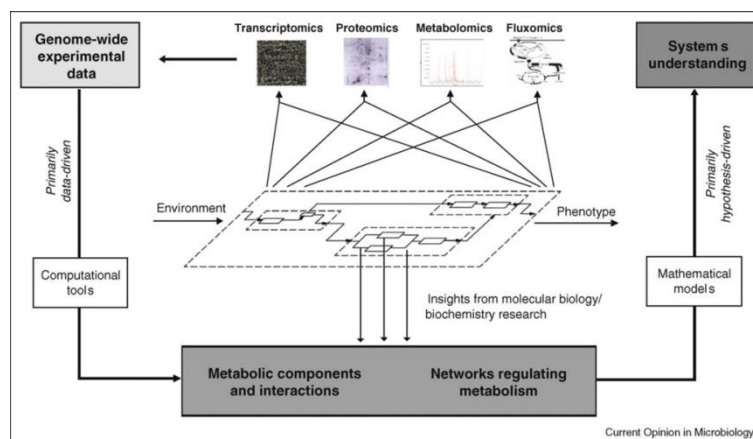


Figure 27 : Représentation d'une approche de biologie des systèmes dans l'analyse du métabolisme bactérien. (Heinemann and Sauer, 2010). L'acquisition de données de type « -omiques » (transcriptome, protéome, métabolome, fluxome etc ...) ainsi que l'utilisation d'outils informatiques permet la reconstruction du réseau métabolique, de ses différents composants et de leurs interactions. L'utilisation de modèles mathématiques permet l'intégration des données.

V.A. Acquisition de sets de données expérimentales pour l'étude du métabolisme

Depuis les années 2000, de nouvelles technologies ont été développées de façon à produire des jeux de données exhaustives (pour review : Trends in Microbiology, May 2014, Vol. 22, No. 5, édition dédiée à ces approches). Dans cette partie, seules les approches de transcriptome, stabilome et métabolome seront développées car elles seront utilisées durant les travaux de cette thèse.

V.A.1. Transcriptome et stabilome

Le transcriptome, permet de mesurer l'ensemble des transcrits, les ARNt, les ARNr et les ARNnc présents dans la cellule (Velculescu *et al.*, 1997).

Différentes approches telles que la réverse transcription et PCR quantitative (qRT-PCR) ou le Northern Blot permettent d'étudier l'expression des transcrits dans la cellule mais sur un nombre réduit de gènes. La qRT-PCR en microfluidique permet d'augmenter largement le nombre de gènes étudiés jusqu'à plus d'un millier (Spurgeon *et al.*, 2008). Le développement des puces à ADN (Schena *et al.*, 1995) suite à l'augmentation du séquençage de génomes entiers, a permis la production d'informations transcriptionnelles à l'échelle du génome (Filiatrault, 2011; Güell *et al.*, 2011). Cette technique a fortement contribué à l'amélioration des connaissances concernant la complexité et la dynamique des transcriptomes bactériens (Passalacqua *et al.*, 2009).

Brièvement, une puce à ADN est constituée de sondes ADN recouvrant l'intégralité du génome d'une souche donnée (4254 gènes pour la souche K12-MG1655) (Selinger *et al.*, 2000). Suite à l'hybridation entre les sondes de la puce et les ADN complémentaires marqués issus de la rétro-transcription des transcrits de la cellule, la quantité de chaque transcrit est mesurée par fluorescence. Une étape de traitement des données est essentielle entre l'acquisition du signal « brut » et l'obtention des données finales du transcriptome. Ces traitements permettent de corriger les données en prenant en compte le bruit de fond inhérent à l'expérience et en normalisant les données qui sont ensuite traitées statistiquement pour être interprétées. Ainsi, on obtient pour chaque transcrit un signal

corrige directement corrélé à son abondance dans la cellule (approche développée par le projet « MicroArray Quality Control (MAQC), édition Septembre 2006 *Nature Biotechnology*).

Une nouvelle génération d'approches d'analyse du transcriptome émerge depuis ces cinq dernières années. Il s'agit de la technique de séquençage des ARN : RNA-Seq, qui contrairement aux autres techniques, ne nécessite pas d'interaction entre sondes et échantillon, mais est basée sur l'alignement de séquences entre les génomes actuellement séquencés et les ARN de l'échantillon préalablement rétro-transcrits en ADN complémentaire puis séquencés (Croucher and Thomson, 2010; Marioni *et al.*, 2008).

Ces données de transcriptome permettent d'appréhender l'expression des gènes dans la cellule. Cependant, les niveaux de transcrits mesurés résultent de leur transcription et de leur dégradation. Afin d'étudier précisément la transcription à l'échelle de la cellule, il est alors indispensable de coupler ces données aux données du stabilome. Le stabilome regroupe l'ensemble des temps de demi-vie de tous les transcrits de la cellule. Expérimentalement, il est obtenu à partir de transcriptomes successifs suite à l'arrêt de la transcription par ajout de rifampicine, antibiotique inhibiteur de l'initiation de la transcription suite au blocage de l'élongation en début de transcrits (Campbell *et al.*, 2001). Ces transcriptomes sont obtenus à partir de puces à ADN (Bernstein *et al.*, 2002; Esquerre *et al.*, 2014, 2015; Redon *et al.*, 2005; Selinger *et al.*, 2000) ou de RNA-Seq (Chen *et al.*, 2015).

V.A.2. Métabolome

L'acquisition des données du métabolome est une étape cruciale de l'étude du métabolisme bactérien par une approche de biologie des systèmes (Reaves and Rabinowitz, 2011). Le métabolome correspond à l'ensemble des concentrations des métabolites intracellulaires et constitue une représentation directe de l'état physiologique de la cellule (Goodacre *et al.*, 2004; van der Werf *et al.*, 2007).

Le métabolisme central d'*E. coli* est composé de plus de 700 métabolites (Keseler *et al.*, 2009), voire deux à trois fois plus si l'on tient compte du fait que certains gènes ont à ce jour une fonction qui reste inconnue (van der Werf *et al.*, 2007). Un large spectre de concentrations est observé pour ces métabolites dans la cellule avec des différences

maximales de l'ordre de 10 000 fois entre les métabolites les plus concentrés et certains précurseurs biosynthétiques (Bennett *et al.*, 2009). Les méthodes de mesures doivent alors permettre de balayer toute cette gamme de concentrations ainsi que les différentes natures physico-chimiques des métabolites. Expérimentalement, les données sont obtenues par spectrométrie de masse couplée à une première étape de séparation par chromatographie liquide, ionique ou gazeuse (LC-MS, IC-MS et GC-MS respectivement) (Büscher *et al.*, 2009, Fiehn, 2008). Des méthodes de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sont également utilisées, notamment pour la quantification de métabolites non chargés (Coen *et al.*, 2008). Quelle que soit la méthode, un standard interne marqué est utilisé de façon à pouvoir quantifier les différents métabolites (Mashego *et al.*, 2004; Taymaz-Nikerel *et al.*, 2009).

Seules, les données de métabolome sont utilisées pour deux objectifs différents (Reaves and Rabinowitz, 2011). D'une part, elles permettent d'obtenir une image générale de l'effet d'une modification donnée sur la répartition des métabolites (délétion de gène, stress, perturbation de l'environnement) et de fait sur l'état physiologique de la cellule. D'autre part, la mesure du métabolome permet de déterminer certains métabolites clés dans certains processus cellulaires (régulation d'une enzyme par exemple).

V.B. Détermination *in silico* de flux métaboliques – Approches de Flux Balance Analysis

Les flux métaboliques sont des éléments fondamentaux de la physiologie cellulaire en condition de croissance équilibrée. Ils représentent quantitativement la contribution des différentes voies cellulaires à la physiologie générale de l'organisme. L'analyse de flux est un moyen communément utilisé pour investiguer les liens entre génotype et phénotype (Covert *et al.*, 2001a). Celle-ci se fait à partir d'un modèle du réseau métabolique implémenté avec des données expérimentales comme des concentrations de molécules marquées en C¹³ (Zamboni and Sauer, 2009) ou d'autres paramètres physiologiques.

La Flux Balance Analysis (FBA) est une des approches mathématiques, qui permet de calculer ou prédire les flux métaboliques à partir d'un modèle de réseau métabolique (Edwards *et al.*, 2002; Orth *et al.*, 2010; Varma and Palsson, 1994). En plus de générer des données quantitatives de flux, cette approche est utilisée afin de combler des étapes

métaboliques actuellement manquantes, d'orienter les décisions de biologie synthétique ou encore afin de simuler des croissances sur différents substrats ou l'effet d'une délétion de certains gènes sur les flux métaboliques (Orth *et al.*, 2010; Varma and Palsson, 1994).

Le développement des méthodes de séquençage et des techniques « -omiques » a accéléré la construction de réseaux métaboliques associés à l'ensemble du génome, appelés « genome-scale metabolic network reconstruction ». Ces réseaux regroupent, pour un organisme, tous les gènes, tous les métabolites, toutes les protéines ainsi que toutes les réactions identifiés et leurs interactions (McCloskey *et al.*, 2013; Reed *et al.*, 2006). Ces réseaux, dont le dernier en date pour *E. coli* K12-MG1655 est celui de Orth et de ses coéquipiers (Orth *et al.*, 2011) constitue la base « métabolique » de cette approche. Une variante de ce réseau intégrant l'activité de la machinerie d'expression a été construit sous le nom de iAF1260ME (Thiele *et al.*, 2012).

V.B.1. Principe

La FBA permet, pour un système à l'équilibre, de déterminer la meilleure distribution de flux possible permettant de maximiser un objectif donné en fonction de contraintes établies (Kauffman *et al.*, 2003). Avant de pouvoir déterminer les flux métaboliques, plusieurs étapes sont nécessaires dont : la définition de la matrice stœchiométrique, la définition de contraintes et la définition de la fonction objective (Figure 28).

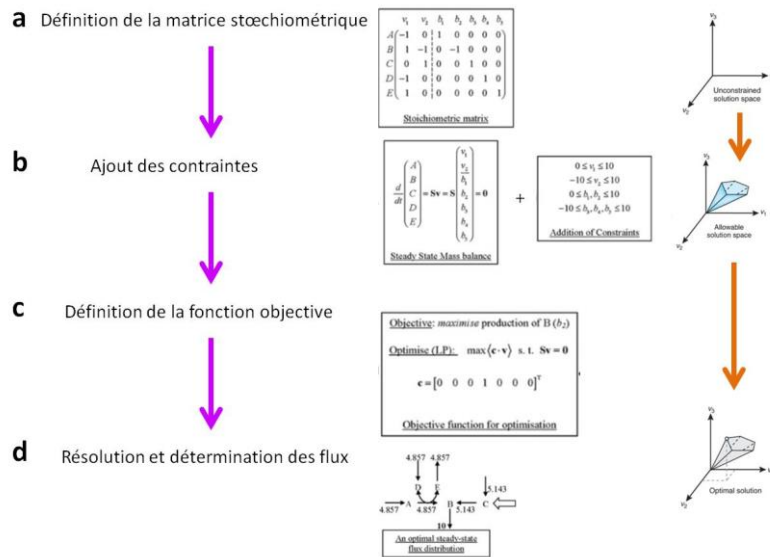


Figure 28 : Représentation des différentes étapes de FBA et de l'évolution associée de l'espace de solutions (Orth *et al.*, 2010; Raman and Chandra, 2009). 4 étapes sont essentielles à une démarche de FBA. Ces étapes permettent, à partir de la reconstruction d'un réseau métabolique à l'état stationnaire sous forme de matrice (a) et de différentes contraintes (b), d'optimiser une fonction objective (c) et déterminer une répartition de flux (d).

i. Définition de la matrice stœchiométrique

La première étape indispensable dans une démarche de détermination de flux métaboliques par FBA, consiste, à partir de la reconstruction du réseau métabolique sélectionné, à établir la matrice stœchiométrique qui permet de représenter mathématiquement le réseau métabolique. La matrice S est composée de m lignes correspondant aux m composés du réseau et de n colonnes correspondant aux n réactions associées au réseau (Figure 28.a). À cette matrice S est associé le vecteur v de longueur n regroupant les flux de chacune des réactions.

A l'état d'équilibre, la condition suivante est vérifiée : $S \cdot v = 0$. L'espace nul de solutions de la matrice représente ainsi l'espace de solutions des flux métaboliques (Kauffman *et al.*, 2003; Orth *et al.*, 2010). Il reste cependant une multitude de solutions possibles liée au caractère sous-dimensionné du réseau. En d'autres termes, il y a beaucoup plus de réactions que de composants dans le réseau et différentes contraintes sont nécessaires afin de réduire l'espace de solutions.

ii. Ajout de contraintes

Les contraintes sont ajoutées sous forme d'équations et/ou sous forme d'inégalités (Figure 28.b). Les contraintes portent sur le sens des réactions du réseau métabolique ou la valeur des flux. On peut par exemple imposer des limites inférieures et supérieures de flux pour chaque réaction, indiquer des valeurs spécifiques sur les flux d'échanges (sur les vitesses spécifiques de consommation ou de production par exemple) ou encore fixer des flux déterminés expérimentalement (Orth *et al.*, 2011; Raman and Chandra, 2009). Il est également possible de contraindre la direction des flux selon le deuxième principe de la thermodynamique. Pour une réaction réversible $A \leftrightarrow B$, si l'on souhaite imposer au système le sens $A \rightarrow B$, il faut alors imposer une variation d'énergie libre (ΔG) négative pour cette réaction (Henry *et al.*, 2006, 2007). La variation d'énergie libre est calculée de la façon suivante :

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K + RT \ln \gamma$$

avec ΔG^0 l'énergie libre standard à 298K
 K la constante d'équilibre déterminée à partir de concentration de métabolites
 γ qui exprime la dépendance à la force ionique
 (déterminée de l'équation de Debye-Hückel étendue (Skoog *et al.*, 2013))

Alors que l'énergie standard ΔG^0 est généralement disponible dans les bases de données, la constante d'équilibre K est directement calculée à partir de données de métabolites expérimentaux mesurés dans les conditions de la prédiction.

L'ajout de ces différentes contraintes contribue à restreindre l'espace de solutions (Figure 28.b) (Covert *et al.*, 2001a; Price *et al.*, 2004).

iii. Définition de la fonction objective

Un des aspects fondamentaux de la FBA est de considérer que la répartition des flux est optimisée en vue d'un certain objectif (Segrè *et al.*, 2002). Ceci est représenté par la définition d'une fonction objective (FO), souvent traduite mathématiquement sous forme de problème linéaire. Il existe différentes fonctions définies selon la question biologique. On peut ainsi chercher à maximiser ou minimiser la production d'un métabolite donné, ou la consommation d'un substrat. La fonction la plus commune reste l'optimisation de la

croissance, traduit pour la FBA comme l'optimisation du taux de production de la biomasse (Feist and Palsson, 2010). Dans ce cas, la biomasse est représentée comme une équation stœchiométrique équilibrée permettant la synthèse de biomasse (protéines, lipides, acides nucléiques...) à partir des métabolites. La question de la FO fait souvent l'objet de débat. Il est communément admis que les souches sauvages ont évolué de façon à optimiser leur croissance en fonction des conditions environnementales (Edwards *et al.*, 2001), l'utilisation de la FO d'optimisation de la croissance est alors pertinente dans ces conditions. Cependant, des mutants de laboratoire, des mutants de délétion par exemple, n'ont pas été soumis à la même pression de sélection et ne présentent probablement pas une optimisation métabolique comme une souche sauvage. L'utilisation d'une FO d'optimisation de la production de biomasse est discutable (Segrè *et al.*, 2002). Une FO permettant la minimisation de la différence entre des flux obtenus expérimentalement et les mêmes flux estimés (Lee *et al.*, 2012; Mahadevan and Schilling, 2003) peut être envisagée dans ces cas-là.

Il est indispensable de traiter préalablement de la pertinence d'une FO donnée afin de déterminer au mieux la FO objective correspondant au système d'intérêt (Burgard and Maranas, 2003).

iv. Résolution de la fonction objective et détermination des flux

L'optimisation de la FO permet de trouver une solution optimale de distribution des flux dans l'espace de solutions défini par les contraintes initialement déterminées (Kauffman *et al.*, 2003, Orth *et al.*, 2010). C'est cette dernière étape qui correspond à la FBA à proprement parler. L'optimisation de la FO est réalisée à l'aide d'algorithmes de programmation linéaire ou quadratique.

V.B.2. Extensions

La FBA permet de prédire correctement le taux de croissance d'*E. coli* sur différents substrats (Edwards *et al.*, 2001) ou de mettre en évidence l'essentialité de certains gènes (Papp *et al.*, 2004). Cependant, cette approche présente certaines limites, comme l'impossibilité d'entrevoir des distributions alternatives liées à la redondance des réseaux métaboliques (Mahadevan and Schilling, 2003), l'absence de contrainte de régulation (Covert

et al., 2001b) et l'impossibilité d'effectuer une étude en dynamique (Covert *et al.*, 2001b; Mahadevan *et al.*, 2002). Différentes extensions de la FBA ont été développées de façon à élargir son spectre d'utilisation et d'augmenter la précision des prédictions.

i. Flux Variability Analysis (FVA) et détermination de l'ensemble des solutions

Alors que la FBA permet d'obtenir une solution optimale parmi plusieurs, une extension de la FBA, la Flux Variability Analysis (FVA) permet d'obtenir l'ensemble des solutions en déterminant pour chaque flux les bornes supérieure et inférieure de l'intervalle de valeurs possibles (Gudmundsson and Thiele, 2010; Mahadevan and Schilling, 2003). C'est pour cette raison que la FVA a été utilisée au cours de ces travaux. Cette approche permet notamment d'explorer d'autres solutions optimales que celle déterminée par la FBA (Mahadevan and Schilling, 2003). Elle a été utilisée entre autre pour étudier la flexibilité et la redondance du réseau métabolique (Thiele *et al.*, 2010).

ii. Dynamic FBA (dFBA) et Regulatory FBA (rFBA)

La FBA en dynamique, ou Dynamic FBA (dFBA) permet, en intégrant la notion de temps, de déterminer l'évolution dynamique des flux. Brièvement, le temps sur lequel le phénomène se déroule est divisé en j intervalles de temps I . Pour chaque intervalle de temps, le système est considéré dans un nouvel état stationnaire. Ainsi pour chaque intervalle I_t (t allant de 0 à j), on effectue une FBA simple en utilisant comme valeurs initiales les résultats obtenus pour l'intervalle I_{t-1} . Les données initiales pour I_0 sont spécifiées par l'utilisateur (Covert *et al.*, 2001b; Mahadevan *et al.*, 2002). Le fait de considérer plusieurs intervalles stables successifs permet de maintenir un système d'équations linéaires. Une telle approche a permis de modéliser correctement la diauxie glucose/acétate (Mahadevan *et al.*, 2002).

La regulatory FBA (rFBA) permet d'intégrer à une approche de FBA simple des contraintes de régulations associées à l'expression des enzymes du réseau. Ces contraintes suivent une logique booléenne ON/OFF, elle-même déterminée par l'état métabolique de la cellule (Covert *et al.*, 2001b). Ces contraintes sont temporaires, corrélées à l'environnement, ce qui impose un caractère dynamique à leur intégration (Covert *et al.*, 2001b). Par exemple,

la transcription d'un gène G (*trans*) dépendante de la présence ou non d'un produit B sera régit par l'équation suivante :

$$trans = \text{IF}(G) \text{ AND NOT}(B)$$

La rFBA a également permis de prédire correctement la diauxie glucose/lactose avec la consommation successive des deux substrats alors qu'une dFBA échoue. Cet échec est dû à l'incapacité de la dFBA à « empêcher » la consommation du lactose ce qui aboutit à la co-consommation des deux substrats, une croissance plus importante et une déplétion plus rapide du lactose (Covert and Palsson, 2002).

V.C. Intégration des données et étude du MCC

Les approches de FBA et ses extensions ainsi que d'autres outils mathématiques peuvent être utilisés afin d'intégrer les différentes données associées au métabolisme. Parmi eux, les modèles mécanistiques permettent de prédire en dynamique l'évolution d'un système et l'analyse de régulation hiérarchique (HRA) permet de quantifier l'importance des régulations métabolique et hiérarchique sur la variation d'un flux entre deux conditions.

V.C.1. FBA et extensions

La FBA et ses extensions permettent de déterminer des flux métaboliques et d'analyser le MCC par l'intégration de données expérimentales. En effet, les contraintes sont définies par différentes données expérimentales : vitesses spécifiques de consommation ou de production, concentrations de métabolites (pour les contraintes thermodynamiques) et niveaux d'expression de gènes (pour les contraintes de rFBA). La FBA et ses différentes extensions sont un outil intéressant pour l'étude du MCC, durant une phase de croissance, une phase stationnaire et également durant une transition métabolique. D'autre part, elles ont permis de mettre en évidence des phénomènes particuliers liés au MCC comme la maximisation de la croissance en fonction de la ressource carbonée grâce à l'optimisation des flux métaboliques (Edwards *et al.*, 2001).

V.C.2. Modélisation mécanistique

Les modèles mécanistiques proposent une approche d'analyse ou de prédiction de la dynamique d'un système (Stelling, 2004). Ces modèles paramétriques permettent de déterminer les effets quantitatifs en dynamique, à l'issue d'une perturbation de l'environnement par exemple. Différents modèles mécanistiques ont été développés chez *E. coli* pour modéliser son métabolisme carboné central en phase de croissance exponentielle (ex : Chassagnole *et al.*, 2002; Peskov *et al.*, 2012; Usuda *et al.*, 2010), lors de la diauxie glucose/lactose (Bettenbrock *et al.*, 2006; Kremling *et al.*, 2001) ou de la transition glucose-acétate (Kotte *et al.*, 2010).

Dans une approche de modélisation mécanistique, le modèle étudié est défini par un système d'équations différentielles ordinaires (ODE) déterminant l'évolution de la concentration de chaque constituant X qui peut être un métabolite, un ARN ou une protéine. La concentration de chaque constituant évolue dans le temps en fonction de sa synthèse, de sa dilution (en cas de croissance) et de sa dégradation ou sa consommation pour les métabolites. La variation de concentration d'un constituant (dX/dt) constitue une équation différentielle. L'ensemble des équations différentielles associées au modèle forme alors un système d'équations à résoudre afin de déterminer l'évolution de chaque composant du système.

La connaissance des cinétiques associées à chacune des réactions métaboliques (Mickaëlis Menten, Monod Wyman et Changeux, Hill etc...) est indispensable (Kitano, 2002a; Stelling, 2004), tout comme celle des différents paramètres cinétiques associés. Cette étape correspond à l'étape limitante de l'utilisation de modèles mécanistiques.

Cette modélisation est envisagée dans les perspectives de ces travaux de thèse concernant l'implémentation des régulations du MCC par CSR.

V.C.3. Analyse de régulation hiérarchique (HRA)

L'analyse de régulation hiérarchique (HRA) permet de quantifier l'importance de la régulation hiérarchique et de la régulation métabolique sur une variation de flux observée entre deux conditions en déterminant deux coefficients de régulation (van Eunen *et al.*, 2011;

Kuile and Westerhoff, 2001). Dans ces travaux de thèse, cette approche sera utilisée pour comparer une souche sauvage et un mutant.

En effet, un flux J dans un état métabolique à l'équilibre peut être défini comme le produit d'une fonction f , fonction de la quantité d'enzyme E catalysant le flux et d'une fonction g , fonction de la concentration des différents effecteurs X_i de l'enzyme et de paramètres cinétiques K associés

$$J = f(E) * g(X_i, K) \quad (1)$$

Ainsi, f décrit la dépendance du flux par rapport à la quantité d'enzyme active (dimension hiérarchique) et g décrit la dépendance du flux par rapport au métabolisme (dimension métabolique). Par exemple, dans le cas d'une enzyme michaélienne, f et g sont définies de la façon suivante :

$$f = Vmax = kcat * E \quad \text{et} \quad g = \frac{S}{(Km+S)} \quad (1')$$

où $Vmax$ (mols/min/mol_E) correspond à l'activité spécifique de l'enzyme, $kcat$ (mols/min) à la constante catalytique, E (mol) à la quantité de l'enzyme E , S (M) à la concentration en substrat S et Km (M) à la constante michaélienne d'affinité de l'enzyme pour son substrat.

On peut procéder à une transformation logarithmique de l'équation (1)

$$\ln(J) = \ln f(E) + \ln g(X_i, K) \quad (2)$$

et représenter ensuite la variation du flux J comme la somme de la variation de la quantité d'enzyme et des variations du métabolisme (variations de la concentration des différents effecteurs de l'enzyme ou variations de la quantité d'enzyme ou de métabolites dans les réactions précédentes).

$$\Delta \ln J = \Delta \ln f(E) + \Delta \ln g(X_i, K) \quad (3)$$

Il est alors possible de décortiquer les effets de chaque régulation, hiérarchique et métabolique, en divisant chaque côté de l'équation (3) par la variation de flux.

$$1 = \frac{\Delta \ln f(E)}{\Delta \ln J} + \frac{\Delta \ln g(X_i, K)}{\Delta \ln J} \quad (4)$$

Deux coefficients sont ainsi obtenus, le coefficient hiérarchique ρ_h et le coefficient métabolique ρ_m , dont la somme est égale à un (van Eunen *et al.*, 2011).

$$\rho_h = \frac{\Delta \ln f(E)}{\Delta \ln J} \quad , \quad \rho_m = \frac{\Delta \ln g(X_i, K)}{\Delta \ln J} \quad \text{et} \quad 1 = \rho_h + \rho_m$$

La valeur de chaque coefficient est représentative du poids de chaque régulation sur la variation du flux. Dès lors, différents cas de figure sont définis (Figure 29).

ρ_h	ρ_m	Situation associée
1	0	Régulation purement hiérarchique
0	1	Régulation purement métabolique
[0;1]	[0;1]	Régulation coopérative ou partagée
>1	<0	Régulation antagoniste dirigée par la concentration de l'enzyme
<0	>1	Régulation antagoniste dirigée par le métabolisme

Figure 29 : Situations associées aux différents couples de coefficients de régulation

On parle de régulation purement hiérarchique quand la variation de flux est entièrement due à la variation de la quantité d'enzyme ($\rho_h = 1$). Une régulation purement métabolique, au contraire, est définie lorsque la variation de flux est intégralement associée à la variation du métabolisme et non à la quantité d'enzyme. Cependant, le métabolisme et la quantité d'enzyme peuvent participer de façon coopérative à la variation de flux, on parle alors de régulation coopérative ou partagée. Dans ce cas, une variation du métabolisme et de la quantité d'enzyme contribuent à modifier le flux dans le même sens. Lorsque les effets de chacune des régulations s'opposent, il s'agit de régulations antagonistes, dirigée par la concentration de l'enzyme si celle-ci varie dans le même sens que le flux, ou dirigée par le métabolisme lorsque celui-ci impose les sens de variation. Par exemple, lors d'une augmentation de flux associée à régulation antagoniste dirigée par la quantité de l'enzyme, la quantité d'enzyme augmente, le flux également mais pas autant que la quantité d'enzyme car le métabolisme varie légèrement mais dans le sens opposé (van Eunen *et al.*, 2011).

Le calcul d'un des deux coefficients est suffisant dans cette approche, le deuxième coefficient étant directement déduit du premier. Les données de flux sont indispensables, quel

que soit le coefficient déterminé à partir des données expérimentales. En pratique, c'est le coefficient hiérarchique ρ_h , qui est déterminé à partir de données expérimentales de mesure d'activité enzymatique (Daran-Lapujade *et al.*, 2007; Kuile and Westerhoff, 2001). Par contre, la fonction $g(X_i, K)$ associée au métabolisme est plus complexe et demande, en plus de la mesure de métabolites, la connaissance des effecteurs de l'enzyme ainsi que les valeurs des paramètres cinétiques associés.

Le principe du calcul associé à l'analyse de régulation hiérarchique peut être utilisé de façon à décortiquer, à partir de données expérimentales, certaines variations observées dans la cellule. Par exemple, une variante de l'analyse de régulation hiérarchique a été utilisée afin d'analyser la régulation hiérarchique en pondérant l'effet du taux de croissance, des régulations transcriptionnelles, post-traductionnelle et de la transcription sur la variation de la quantité d'enzyme (Daran-Lapujade *et al.*, 2007). Cette approche a mis en évidence que chez la levure, *Saccharomyces cerevisiae*, la régulation hiérarchique des flux glycolytiques est principalement post-transcriptionnelle. Plus généralement, des approches de HRA ont permis de mettre en évidence une réelle importance des régulations métaboliques dans la régulation du MCC chez la levure (Gerosa and Sauer, 2011; Kuile and Westerhoff, 2001; Rossell *et al.*, 2005).

VI. Objectifs de thèse

Cette étude bibliographique met en avant la complexité et l'importance de la régulation du MCC dans l'adaptation d'*E. coli* à son environnement. Le développement des techniques d'acquisition de données quantitatives à chacun des niveaux de régulation (ARN, stabilité, protéine, métabolite etc...) et celui des approches de modélisation et d'intégration de ces données ont contribué à améliorer la compréhension du MCC. Cependant, la compréhension des réseaux de régulation et de leurs interactions reste incomplète à ce jour. Elle représente désormais un enjeu majeur de la biologie des systèmes appliquée à la microbiologie. Actuellement, un des éléments qui fait défaut à l'analyse du MCC est l'intégration des différentes régulations post-transcriptionnelles au même titre que les régulations transcriptionnelles ou métaboliques. Plus particulièrement, l'implication du système post-transcriptionnel CSR, système de régulation global, essentiel en présence de glucose, n'a pas été complètement analysée dans la régulation du MCC et plus largement dans l'adaptation d'*E. coli* face à la disponibilité en carbone.

Ces travaux de thèse visent à approfondir et définir le rôle du système de régulation post-transcriptionnelle CSR dans la régulation du MCC chez *E. coli*. Quelle est son implication dans la régulation d'un métabolisme de croissance sur glucose ? Joue-t-il un rôle dans la régulation d'une transition métabolique ? Enfin plus globalement, quelle est l'importance des régulations post-transcriptionnelles, et plus particulièrement celles associées au système CSR, dans la régulation de l'expression génique face à la disponibilité en carbone ?

Alors que les données de la littérature soulignent une régulation positive des enzymes glycolytiques par la protéine CsrA, ces données sont issues de différentes études non homogènes et surtout non menées dans des conditions optimales pour l'étude d'un métabolisme glycolytique. De plus, aucune analyse approfondie n'a été effectuée pour déterminer les raisons de l'essentialité de la protéine CsrA lors d'une croissance sur glucose. Pour mieux comprendre l'implication de CSR en présence de glucose, nous avons analysé le comportement de la souche *csrA51*, souche dont l'activité de la protéine CsrA a été fortement diminuée par rapport à la souche sauvage, en croissance sur milieu minimum supplémenté en glucose. Pour cette souche comme pour la souche sauvage K12 MG1655 (WT), nous voulons

développer une approche systémique et acquérir des données phénotypiques ainsi que les données moléculaires associées aux différents composants du MCC : ARNm, flux, métabolites et enzymes. L'analyse comparative des données obtenues pour la WT et la souche *csrA51* permet de cibler les composantes du MCC affectées par une atténuation du système CSR et d'émettre des hypothèses concises quant à/aux l'origine(s) de la létalité d'une délétion de *csrA* sur glucose.

L'importance des transitions métaboliques, dans l'adaptation d'*E. coli* à son environnement a été abordée dans la partie bibliographique. La transition d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme gluconéogénique est une transition métabolique effectuée par *E. coli*, lui permettant de se maintenir dans l'environnement intestinal. Alors que le système CSR est connu pour réguler des phénomènes adaptatifs et qu'il régule de façon antagoniste ces deux métabolismes, aucune étude dynamique n'a été effectuée pour démontrer sa réelle implication dans la régulation d'une telle transition. Afin d'étudier cette question, nous avons choisi la transition glucose-acétate décrite précédemment (III.C.2.i) comme modèle d'étude. Cette transition a fait l'objet depuis plusieurs années de collaborations au sein du LISBP et également avec l'INRIA Grenoble Rhône-Alpes. Ainsi, différentes données et connaissances préliminaires sont disponibles pour cette étude. Afin de caractériser le rôle de CSR lors de la transition glucose-acétate, nous avons décidé d'utiliser en plus de la WT et de la souche *csrA51*, les souches : $\Delta csrBC$ et $\Delta csrD$ respectivement délétées pour les deux ARNc CrsB et CrsC et pour la protéine CsrD dans le background génétique de la souche K12 MG1655. Alors que la souche *csrA51* produit moins d'acétate que le WT et compromet l'analyse du rôle de CSR dans la régulation du MCC lors de la transition glucose-acétate, ce n'est pas le cas pour les deux souches $\Delta csrBC$ et $\Delta csrD$. De plus, ces deux souches constituent deux nouveaux mutants du système CSR améliorant l'analyse du rôle de ce système. Pour chacune des souches, nous avons suivi en dynamique l'évolution de la concentration de transcrits des gènes du MCC et celles des métabolites intra et extracellulaires lors de la transition. D'autre part, nous avons également étudié leur capacité à repartir en croissance sur un milieu riche en acétate alors qu'elles étaient préalablement en phase de croissance sur glucose ou en phase de consommation d'acétate. Ces approches ainsi que l'utilisation supplémentaire de deux souches incapables de synthétiser du glycogène nous permettent de valider l'implication

du système CSR dans l'adaptation métabolique durant la transition glucose-acétate bien que celle-ci soit indirecte.

Finalement, l'étude bibliographique a montré que les régulations post-transcriptionnelles à l'échelle du génome chez les procaryotes ont été peu abordées. Alors que des exemples localisés illustrent le rôle de ces régulations dans des phénomènes adaptatifs (exemple du stress aux hexoses phosphates), leur rôle dans la régulation de l'ensemble des transcrits et de leur stabilité lors d'une transition métabolique n'a pas été caractérisé. De fait, il en est de même concernant l'importance des régulations post-transcriptionnelles par CSR. Dans cette thèse nous avons mesuré, pour la souche K12 MG1655, les transcriptomes et stabilomes au cours de la dynamique de la transition glucose-acétate suivie d'une phase de carence carbone (après épuisement de l'acétate). Ce travail nous permet d'analyser les évolutions de l'expression de l'ensemble du génome et de la stabilité de l'ensemble des transcrits au cours d'une adaptation métabolique. Pour évaluer le rôle des régulations post-transcriptionnelles, les transcrits dont les variations sont imposées par une modification de leur transcription ou par une variation de leur stabilité sont différenciés par une analyse de coefficient de régulation. La recherche de régulateurs spécifiques, et notamment de celui du régulateur post-transcriptionnel CsrA parmi les gènes dont l'expression est contrôlée par la modification de leur stabilité, permet d'appréhender l'implication de ce régulateur dans la dynamique et sur l'ensemble du génome. Ces analyses apportent un nouveau niveau de connaissance sur la transition glucose-acétate et permettent de mesurer l'importance des régulations post transcriptionnelles durant l'adaptation face à la disponibilité en carbone. Nos travaux menés pour une souche sauvage, constituent également une base d'étude de l'effet de tout régulateur post-transcriptionnel durant cette transition. La production de données similaires pour les souches *csrA51* et $\Delta csrBC$ en phase de croissance exponentielle sur glucose, permettant de caractériser l'étendue du rôle de CSR sur la régulation de la stabilité des ARNm chez *E. coli* a été faite durant cette thèse. Cependant, l'analyse de ces données est en cours à l'heure de l'écriture de ce manuscrit et ne pourra y être présentée.

CHAPITRE 1

**Régulation du métabolisme glycolytique
par le régulateur post-transcriptionnel**

CSR

La régulation du métabolisme carboné central (MCC) en fonction des ressources carbonées disponibles est essentielle à la production d'énergie et de précurseurs biosynthétiques indispensables à la croissance et/ou à la survie des bactéries. Alors que de nombreuses études se sont intéressées aux leviers transcriptionnels et post-traductionnels de la régulation du MCC, peu d'intérêt a été porté à l'importance globale des régulations post-transcriptionnelles.

Le système de régulation post-transcriptionnel CSR est un régulateur global impliqué dans la régulation de nombreux phénomènes physiologiques (pour revue : Timmermans et Melderer, 2010 ; Romeo *et al.*, 2013). L'élément central de ce système est la protéine CsrA, capable de modifier la stabilité et/ou l'initiation de la traduction de certains ARNm en interagissant directement avec eux. L'implication du système CSR dans la régulation du MCC et notamment de la glycolyse a été mise en évidence en 1995 (Roméo *et al.*, 1993, Sabnis *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2000). Ces travaux mettent en évidence une régulation positive des gènes glycolytiques par la protéine CsrA. D'autre part, la protéine CsrA est décrite comme une protéine essentielle pour *E. coli* lors de croissance sur glucose (Altier *et al.*, 2000; Timmermans and Melderer, 2009). Cette observation tout à fait surprenante, étant donnée l'absence de telles observations pour d'autres régulateurs globaux (Adams and McLean, 1999; Nguyen *et al.*, 2011; Sabourin and Beckwith, 1975), n'a cependant pas fait l'objet de recherches approfondies à ce jour. Une seule hypothèse a été évoquée mais jamais validée : l'accumulation de glycogène en l'absence de la protéine CsrA sur substrat glycolytique serait si importante que cela compromettrait toute croissance.

Nous avons donc choisi d'approfondir l'influence des régulations du MCC par la protéine CsrA et de déterminer les raisons de l'essentialité de cette protéine lorsque les cellules sont en présence de glucose. Pour cela, nous avons utilisé une approche intégrative basée sur la comparaison et l'intégration de données physiologiques et moléculaires obtenues pour deux souches : la souche sauvage K12-MG1655 (WT) et la souche *csrA51* (Esquerre *et al.*, (soumis)), souche viable sur glucose mais dont l'activité de la protéine CsrA est diminuée par délétion des 10 derniers acides aminés. Ces deux souches ont été cultivées en bioréacteurs dans un milieu minimum uniquement supplémenté avec du glucose et de la thiamine afin

d'analyser leur métabolisme glycolytique. Les échantillons prélevés durant la croissance exponentielle ont permis, pour la première fois, de déterminer dans une même condition, les paramètres phénotypiques de croissance (taux de croissance, vitesses spécifiques de consommation ou de production, bilan carbone) et de mesurer différentes composantes moléculaires comme : la quantité de transcrits du MCC, la concentration des métabolites intracellulaires et les activités spécifiques enzymatiques. Des outils d'analyse du métabolisme comme la Flux Variability Analysis (FVA) et la Hierarchical Regulation Analysis (HRA) ont également été utilisés pour comparer ces deux souches.

La croissance sur glucose de la souche *csrA51* est plus lente que celle du WT. Celle-ci est associée à une diminution de la vitesse spécifique de consommation du glucose et à l'absence de produit de fermentation. Alors que la production de biomasse finale est similaire entre les deux souches, ces résultats indiquent dans un premier temps que le défaut de croissance de la souche *csrA51* est corrélé à l'assimilation du glucose réduite.

L'analyse comparative des différents niveaux moléculaires (transcrits, métabolites, enzymes et flux) a mis en évidence une importante réorganisation du MCC chez la souche *csrA51* et ce, à tous les niveaux moléculaires. Le taux de croissance étant un facteur déterminant des différentes composantes moléculaires, l'utilisation de données obtenues pour la souche K12 MG1655 à un taux de croissance comparable à celui de la souche *csrA51* a permis de dissocier les effets observés directement associés à une diminution de l'activité de CsrA des effets liés à la diminution du taux de croissance. Ainsi nous avons pu mettre en évidence une forte diminution des quantités de transcrits glycolytiques, des quantités d'enzymes glycolytiques et des flux glycolytiques dans la souche *csrA51* et une augmentation des composantes moléculaires de la voie de synthèse du glycogène. Une analyse de HRA a montré que les modifications observées dans la souche mutante pour les voies glycolytiques et glyco-géniques résultent essentiellement d'une modification des niveaux de transcrits associés, plutôt qu'une modification des métabolites, sauf pour le flux catalysé par la phosphofructokinase A (PfkA) qui résulte à la fois d'une modification du niveau de transcrit de *pfkA* et d'une modification des métabolites effecteurs de l'enzyme. Aussi, la diminution de la glycolyse dans cette souche s'accompagne d'une accumulation des métabolites G6P et F6P en

amont de l'étape catalysée par la PfkA. En utilisant des substrats entrant en aval de l'étape métabolique catalysée par PfkA, nous avons montré que le défaut de croissance de la souche *csrA51* disparaît et donc que le problème de croissance est associé une forte diminution de cette étape métabolique. L'accumulation de glycogène dans la souche *csrA51*, quelles que soient les conditions de culture, invalide l'hypothèse précédemment évoquée concernant l'origine de l'essentialité de la protéine CsrA. D'autre part, nous avons montré que, dans la souche mutante, l'accumulation des métabolites G6P et F6P provoque une réponse appelée stress aux hexoses phosphate qui a pour effet d'inhiber la traduction de l'ARNm du gène *ptsG* codant pour la sous-unité EIIBC^{GLC} du PTS glucose, de diminuer l'entrée du glucose et de réduire alors la croissance. La surexpression du gène *pfkA* dans la souche *csrA51* a permis de rétablir les concentrations de G6P et de F6P à des niveaux comparables de ceux de la souche WT et de supprimer le stress aux hexoses phosphate. Cependant, même si cette surexpression entraîne une amélioration de la croissance de la souche, la croissance n'est pas totalement rétablie.

En conclusion, ces travaux démontrent l'importance fondamentale du système CSR dans la régulation de la partie supérieure de la glycolyse et notamment de l'étape catalysée par la PfkA. Le stress aux hexoses phosphate provoqué par une mauvaise régulation du MCC par CSR a des conséquences dramatiques sur la croissance des cellules. Ces observations apportent aujourd'hui une explication nouvelle concernant l'essentialité du système CSR sur glucose. Ces travaux soulignent également l'importance des régulations post transcriptionnelles comme le stress aux hexoses phosphate dans la régulation du MCC.

Ces travaux ont été rédigés sous la forme d'un article actuellement en révision dans le journal *Molecular Microbiology*.

The post-transcriptional regulatory system CSR controls the balance of metabolic pools in the upper glycolysis of *Escherichia coli*

Manon MORIN^{1,2,3,4}, Delphine ROPERS^{4*}, Fabien LETISSE^{1,2,3}, Sandrine LAGUERRE^{1,2,3}, Jean-Charles PORTAIS^{1,2,3}, Muriel COCAIGN-BOUSQUET^{1,2,3*#} and Brice ENJALBERT^{1,2,3#}.

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, LISBP, F-31400 Toulouse, France.

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France.

⁴ Inria Grenoble-Rhône-Alpes. 655 avenue de l'Europe, 38334 Montbonnot Cedex. France

* Authors to whom correspondence should be addressed;

Muriel Cocaign-Bousquet (E. mail: cocaign@insa-toulouse.fr ; Phone: +33 (0)5 61 55 94 65 ; Fax : +33 (0)5 61 55 94 00).

Delphine Ropers (E. mail: delphine.ropers@inria.fr; Phone : +33 (0)4 76 61 53 72 ; Fax: +33 (0)4 56 52 71 20).

These authors contributed equally to the work

Keywords: Carbon metabolism/ Constraint-based modelling CSR system/ *Escherichia coli*/ Hierarchical regulation analysis.

Running title: Impact of the CSR system on upper glycolysis.

ABSTRACT

Metabolic control in *Escherichia coli* is a complex process involving multi-level regulatory systems but the involvement of post-transcriptional regulation is uncertain. The post-transcriptional regulator CsrA is reported as being essential for the use of glycolytic substrates. A dozen enzymatic activities have been reported to be controlled by CsrA. To identify which activities are the most important targets of CsrA in the central carbon metabolism, a multi-scale analysis was performed in a wild-type strain and its isogenic mutant attenuated for CsrA (including growth parameters, gene expression levels, concentrations of metabolites, enzyme activities and fluxes). Data integration and hierarchical control analysis pinpointed a coordinated control of the expression of glycolytic enzymes and the imbalance of metabolite pools in the upper glycolysis in the mutant, before the phosphofructokinase PfkA step. This imbalance is associated with a glucose-6-phosphate stress, which only occurs with substrates entering glycolysis before the PfkA step. Restoring PfkA activity in the *csrA* mutant strain alleviated this stress and increase the *csrA* mutant growth rate on glucose,. This work provides conclusive answers to the question of CsrA essentiality and demonstrates the power of post-transcriptional regulation to reshape the central carbon metabolism.

INTRODUCTION

The central carbon metabolism (CCM) is the essential core of bio-precursors and energy production in most living cells including the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. The interconnected pathways composing the CCM include glycolysis, gluconeogenesis, the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) and pentose phosphate pathways (PPP) (Holms, 1996). Carbon and energy fluxes in the CCM are highly regulated in a complex, multi-level network with many control loops (Enjalbert *et al.*, 2011; Heinemann and Sauer, 2010; Kotte *et al.*, 2010; Shimizu, 2013). In contrast to transcriptional and post-translational controls, the occurrence of post-transcriptional control (i.e. regulation of mRNA stability and translation) remains poorly characterized in *E. coli*.

The post-transcriptional regulatory system CSR (carbon storage regulator) is involved in the regulation of the central carbon metabolism (CCM), as well as of a wide range of physiological processes including biofilm formation, peptide uptake, motility, virulence, and carbohydrate storage (Romeo *et al.*, 2013b; Timmermans and Melderer, 2010; Vakulskas *et al.*, 2015). The CSR system is said to be essential for growth on glycolytic media (Altier *et al.*, 2000; Timmermans and Melderer, 2009). This is a surprising property for a post-transcriptional regulator, given that other global or pleiotropic regulators such as ppGpp, Crp-cAMP or RpoS are not essential (Adams and McLean, 1999; Nguyen *et al.*, 2011; Sabourin and Beckwith, 1975). The essentiality could be related to the over-accumulation of glycogen in the mutant (Timmermans and Melderer, 2009). This point is not clear since it was recently reported that the flux of carbon diverted towards glycogen formation in the *Nissle 1917 E. coli* strain is much too low to significantly alter the overall carbon fluxes (Revelles *et al.*, 2013). Thus, the significance of the CSR system in the CCM control is still under debate.

The main component of the CSR system is the global regulator CsrA. This protein prevents the translation of target mRNAs by binding near the ribosome binding site, thereby inhibiting translation and/or facilitating mRNA decay (Duss *et al.*, 2014; Seyll and Van Melderer, 2013; Timmermans and Melderer, 2010). CsrA can also mediate gene activation by stabilizing target transcripts, but the demonstration of such mechanisms is still rare in the literature (Patterson-Fortin *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2000a; Yakhnin *et al.*, 2013). Based on the

measurement of activity or on proteomic assays, the CSR system has been described as a regulator of a dozen targets in the CCM (positive effect on Pgi, PfkA, TpiA, Eno, PykF and Acs, and negative control on Pgm, GlgA, GlgB, GlgC, PfkB and Pps; (McKee *et al.*, 2012; Sabnis *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000a; Yang *et al.*, 1996)). The importance of these regulations in the CCM itself is unknown.

Here, we assessed the influence of CsrA on the CCM. A multi-level investigation was performed in a mutant strain with an attenuated CsrA protein and its isogenic wild-type to refine the list of CSR targets in the CCM and to identify any metabolic perturbations. The use of these datasets combined with modelling and experimental confirmation of the model results enabled us to demonstrate the crucial role of the CSR system in the upper part of the glycolysis. This work highlights for the first time the dramatic role of post-transcriptional regulation in the correct tuning of the central carbon metabolism.

RESULTS

The csrA51 strain displayed a growth defect associated with a low glucose uptake rate on glucose-based minimal medium.

To assess the influence of CsrA on the CCM, the behavior of the strain *E. coli* MG1655 on glucose in various media was compared to its isogenic *csrA51* mutant strain carrying an attenuated but viable variant of CsrA (deletion of the last 10 amino acids of the protein; Esquerré *et al.*, (submitted); (Romeo and Gong, 1993; Romeo *et al.*, 1993a). As expected (Romeo *et al.*, 1993a; Sabnis *et al.*, 1995), we confirmed that the mutation did not significantly affect the growth rate on rich LB medium in Erlenmeyer flask (maximum growth rates $\mu = 1.38 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ for the *csrA51* strain and $1.26 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ for the wild-type ; Table 1). Due to the essentiality of *csrA* for growth on glucose, this carbon source is expected to negatively affect growth of the *csrA51* strain. Addition of glucose to the LB reduced the maximum growth rate of the *csrA51* strain to $\mu = 0.96 \pm 0.18 \text{ h}^{-1}$ while it increased the wild-type (WT) maximum growth rate to $\mu = 1.52 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$. The negative influence of glucose on the mutant was also assessed by growing both strains on M9 minimal medium with glucose as the sole carbon source. The

cultures were performed in well controlled conditions in bioreactors (controlled oxygenation, temperature and pH; see Experimental Procedures section). In these conditions, the *csrA51* strain grew significantly more slowly than the WT strain with a maximum growth rate reduced to 54% of that of the WT strain (Table 1). Likewise, the specific consumption rate of glucose was 58% lower in the *csrA51* strain than in the WT strain. In both strains, acetate accumulated throughout the exponential phase but for the *csrA51* strain, acetate accumulation was reduced to 6% of that in the WT strain (Table 1), confirming results previously obtained with *csrB* over-expression (McKee *et al.*, 2012). Aside from acetate, no fermentation products accumulated in the mutant, as demonstrated by total organic carbon assays (supplementary data file S1). As expected from the literature (Yang *et al.*, 1996), glycogen content is 6.8 times higher in the *csrA51* strain than in the wild-type. CO₂ was also quantified in the gas phase where the production of CO₂ was demonstrated to be lower in the *csrA51* strain than in the WT (Table 1). From these data, we calculated that the same fraction of consumed carbon (59%) is diverted toward biomass in both the WT and *csrA51* strains. This suggests that the growth defect of the *csrA51* strain on glucose is not related to a decrease in the efficiency of biomass synthesis but rather to a reduction in the rate of glucose consumption.

Impact of CSR on CCM fluxes.

From the data gathered during growth on M9 medium (Table 1), we computed the intracellular distribution of fluxes in the wild-type and *csrA51* strains. This was performed by means of constraint-based modeling, using a recent reconstruction of the *E. coli* genome (Feist *et al.*, 2007) and additional constraints (see supplementary table S2). Fluxes were not found by optimizing biomass production, which cannot be granted in the mutant strain. Rather, by analyzing flux variability (Mahadevan and Schilling, 2003), we determined the minimum and maximum values of fluxes satisfying the constraints and supporting secretion, uptake, and growth rates consistent with the measurements of Table 1 (see Experimental Procedures section and supplementary table S2 for details). Given these constraints, the flux intervals determined by this approach were really tight except for both PFKA and PYK fluxes, which belong to a class of fluxes that are particularly hard to constrain (Table 2). Higher fluxes were

calculated in the glycogen synthesis pathway for the *csrA51* strain whereas the glycolytic, pentose phosphate, and TCA fluxes decreased. Except for fluxes of pentose phosphate, similar tendencies were obtained in ¹³C-labelling experiments in the *csrA51* strain in a Nissle 1917 genetic background (Revelles et al, 2013). We conclude that phenotypic differences observed between both strains in Table 1 are associated with an important flux reshaping.

Impact of CSR on CCM gene expression.

The phenotypes and fluxes are deeply impacted in the *csrA51* strain. This has to be very likely related to differential gene expression in the *csrA51* mutant. There is ample information about the effect of CSR on the CCM gene expression in the literature. However, the information is scattered in different works performed with a variety of measurement approaches, genetic backgrounds and growth conditions. It is thus not possible to investigate which gene expression is the most affected by the CSR system. To access this information, we re-investigated the impact of CSR on the gene expression level during the exponential growth on M9 supplemented with glucose (Figure 1). Most of the transcript levels of previously identified CSR targets were therefore significantly modified in the *csrA51* strain. Qualitatively, higher expression of the *glgC* gene (involved in glycogen biosynthesis) was found in the *csrA51* strain (Liu *et al.*, 1995b; Romeo *et al.*, 1993a; Sabnis *et al.*, 1995). All the glycolytic genes were noticeably less expressed in the mutant, while gluconeogenic genes presented non-significant variations. No such clear trend was identified for genes belonging to TCA, its related anaplerotic reactions, or acetate metabolism, despite significant variations in the expression of *sdh*, *mdh*, *acs* and *pck* (all of which were up-regulated in the *csrA51* strain). Quantitatively, the higher negative impacts by *csrA* were observed for *glgC*, *pgm*, *pckA* and *acs*. The glycolytic genes up-regulation by CsrA is remarkable since half of their expression level on glucose depends on the post-transcriptional factor (*ptsG*, *pgi*, *pfkA*, *tpi*, *eno* and *pyk*).

Impact of CSR on CCM enzymatic levels.

CsrA is known to modulate gene expression through the control of RNA stability; it can also modify translation level by interfering with the ribosome fixation. We therefore investigated

if enzymatic levels follow differential gene expressions in the CCM (Figure 2). As for their transcripts, the levels of the glycogenic enzymes GlgC and Pgm are increased in the *csrA51* mutant while the level of the glycolytic enzymes decreased. Here, the exceptions are the glyoxylate shunt enzymes AceA and AceB whose activities were significantly up-regulated in contrast to their gene expression. Phosphofructokinase A (PfkA) appeared to be the most affected glycolytic enzyme with respect to both transcript levels (Figure 1) and activities (Figure 2). These results underline the prevalence of the enzymatic regulation at the mRNA level, and strengthen that glycolytic genes are conjointly up-regulated by CsrA.

We then investigated if the observed impacts on glycogenic, glycolytic and TCA-related gene expression could indirectly result from the growth rate reduction of the *csrA51* strain in regard to the wild-type strain. This was answered by comparing enzymatic levels in the wild-type strain during chemostatic growth at 0.3 h^{-1} (i.e., the *csrA51* growth rate) and enzymatic levels in the wild-type strain at its maximal growth rate on M9-glucose (0.6 h^{-1}). Data were obtained by personal communication. Indeed, this revealed that the increased enzymatic levels of AceA, AceB and Pck observed in the mutant can be obtained solely by decreasing the growth rate. In contrast, glycogenic and glycolytic levels are mostly not affected by the growth rate reduction.

Impact of CSR on CCM metabolites.

Since redistribution of the fluxes in the *csrA51* mutant is likely to alter the metabolite pools, we investigated the concentrations of metabolites in both the CSR mutant and in the wild-type strain. Half of the measured intracellular metabolic pools were significantly modified in the *csrA51* strain (Figure 3). Glycogen content and the concentration of its precursor (ADP-Glucose) were respectively 7 and 5 times higher in the *csrA51* strain. Likewise, metabolite pools from the upper glycolysis (G6P and F6P) were 2.5 times higher in the *csrA51* cells. Metabolite pools of the pentose phosphate pathway (6PG, S7P and R5P) increased from 1.5 to 3 times in the *csrA51* strain. In contrast, no significant difference was found in metabolite pools downstream of F6P in the glycolytic pathway (FBP, 2,3PG and PEP) or in the TCA, except for the fumarate pool, which was significantly reduced in the *csrA51* strain. Again, we

investigated if the differential metabolite concentrations could result from the reduced growth rate in the *csrA51* strain (Figure 3) (data for $\mu=0.3\text{h}^{-1}$ obtained by personal communication). This reveals that the lower metabolite pools observed in the TCA cycle of the mutant can be explained by the growth rate reduction while the over-accumulation of metabolites in the upper glycolysis is more directly related to the mutation. These results strengthen the idea that the core function of CSR in the CCM is the regulation of upper glycolysis activities to regulate the metabolic pools and glycogen production.

Glycolytic activities are mainly under hierarchical control.

The multi-level analysis demonstrated a strong control of glycolytic gene expression by CsrA. Given the significant variations in metabolic pools in the mutant, we wondered what control regulates flux modifications in the *csrA51* strain: hierarchical control or metabolic control. We thus used hierarchical regulation analysis (HRA; van Eunen *et al.*, 2011; Kuile and Westerhoff, 2001) to quantify to which extent the metabolism and gene expression regulate the fluxes related to glycolysis or glycogenesis. For each reaction, sets of hierarchical regulation coefficients were calculated from the specific activities of the different replicates of each strain, and the lower and upper bounds of the fluxes (see Experimental Procedures section and supplementary data file S3 for more details). The boxplots in Figure 4 summarize the results obtained for each reaction. A reaction that is purely regulated by gene expression has a coefficient $\rho_h = 1$. Conversely, a reaction that is solely regulated by metabolites has a $\rho_h = 0$. $0 < \rho_h < 1$ indicates that the regulation of the reaction is shared by the metabolism and gene expression, while $\rho_h > 1$ indicates that the metabolism and gene expression have antagonistic effects. For example, an increase in V_{\max} due to higher gene expression is compensated by a decrease in the concentration of the substrate. A purely hierarchical regulation was obtained for *PGI* (median of hierarchical coefficients close to 1, and 0 for the metabolic coefficients), which means that the decrease in this flux is correlated with the decrease in its enzyme level. The regulation of *PGM*, *GLGC* and *TPI* fluxes appeared to be antagonistic but dominated by the hierarchical regulation (the modifications in the fluxes are controlled by the quantities of enzymes but the metabolism counteracts this genetic control). Finally, the *PFK* flux was the only one displaying equitably balanced flux regulation between

hierarchical and metabolic control. In other words, *PFK* reaction presents the highest metabolic influence of the set of reactions investigated here. The *PFK* flux was thus reduced in the *csrA51* strain not only because of the decrease in the quantity of this enzyme but also because of metabolic regulations leading to decreased enzymatic rates.

The csrA51 mutant growth defect is limited to substrates that require phosphofructokinase activity and is associated to hexose phosphate stress.

The previous results showed that the *csrA51* strain has (i) a reduced glucose entrance rate (Table 1), (ii) accumulation of metabolites before the phosphofructokinase step of the glycolysis (Figure 3), and (iii) limitation of Pfk activity due to dual genetic and metabolic control (Figure 4). To establish a causal relationship between these observations, we grew WT and *csrA51* strains on several glycolytic substrates entering the CCM upstream (glucose and N-acetylglucosamine) or downstream (fructose and fucose) the PfkA mediated metabolic step (metabolic pathways summarized in Figure 5A). The *csrA51* strain displayed a growth defect on both N-acetylglucosamine and glucose, whereas no measurable difference was observed between the mutant and the WT during growth on fucose or fructose (Figure 5B). These results confirmed that the growth defect of the *csrA51* strain originated in the early steps of glucose metabolization, thus identifying the involvement of PfkA as a key metabolic step. A controversial report pinpointed the accumulation of glycogen as the cause of the growth defect of a $\Delta csrA$ strain on glucose due to hijacking of the carbon flux toward this storage compound (Timmermans and Melderer, 2009). This report disagrees with our results, which establish the phosphofructokinase metabolic step as the pivot of the growth defect. To clarify this point, *csrA51* strain was grown on minimal media supplemented with either glucose, or N-acetylglucosamine, or fructose, or fucose, and the intracellular glycogen concentration was quantified (Figure 5B). Independently of the substrate, the *csrA51* cells accumulated higher content of glycogen than the WT strain. Therefore, over-accumulation of glycogen in the *csrA51* strain is independent of the type of glycolytic substrate and hence independent of the growth defect. This result goes against the hypothesis of glycogen accumulation as the cause

of the growth defect, as previously objected (Revelles *et al.*, 2013). We conclude that glycogen accumulation is more likely a side effect of CsrA attenuation.

The G6P and/or F6P over-accumulation (as observed in the *csrA51* mutant; Figure 3) is known to trigger a feedback regulatory loop known as “hexose phosphate stress” (Morita *et al.*, 2003). The accumulation of these sugars phosphate indirectly induces the expression of the non-coding RNA (ncRNA) SgrS (Rice and Vanderpool, 2011; Vanderpool, 2007). SgrS triggers the degradation of the *ptsG* mRNA, encoding an essential component of the glucose transport system. This results in a reduction in the glucose consumption rate, and hence it results in a reduction of the sugars phosphate pools to counteract the stress. Since the pools of G6P and F6P were 2.5 to 3 times higher in the *csrA51* strain and the *ptsG* level was reduced (Figures 1 & 3), we looked for molecular evidence of glucose phosphate stress by investigating the level of SgrS transcript in both strains grown on glucose, N-acetylglucosamine, fructose, or fucose. SgrS transcript levels were 5 to 9 times higher in the *csrA51* grown on glucose and N-acetylglucosamine respectively (Figure 5). Such induction was not found in the two strains grown on fructose or fucose. These results are evidence of the existence of glucose phosphate stress coupled with a growth defect of the *csrA51* strain grown on substrates that require phosphofructokinase activity.

In conclusion, *csrA51* growth defect is not associated to glycogen accumulation but to hexose phosphate stress when the mutant is grown on substrate entering the glycolytic pathway above the phosphofructokinase step.

Overexpression of PfkA alleviates the hexose phosphate stress and partially restores the growth rate of the csrA51 mutant.

A deletion of *pfkA* has been reported to present a strong growth defect on glucose medium with a growth rate close to 0.1 h^{-1} but no growth defect on fructose (Fischer and Sauer, 2003; Nakahigashi *et al.*, 2009). We therefore hypothesized that the limited PfkA activity inherent to the *csrA51* strain could be sufficient to explain the growth defect directly by blocking the glycolytic pathway, or indirectly through the feedback loop of the glucose

phosphate stress. We assessed this by overexpressing the *pfkA* gene in the WT and *csrA51* strains and growing them on M9 glucose (Figure 6). Measurements of *pfkA* mRNA levels and of PfkA enzymatic activities showed that the overexpression enabled *pfkA* expression and phosphofructokinase activity to be restored at the WT's levels in the *csrA51* strain (Figures 6A and 6B). We then investigated the effect of the overexpression on the metabolic pools and the hexose phosphate stress. Overexpressing *pfkA* in the *csrA51* strain is sufficient to prevent the accumulation of G6P and F6P (Figure 6C). Interestingly, while *csrA51* increased most metabolic pools before the TCA cycle, the overexpression of *pfkA* decreased most of this pools to levels under the wild-type ones (supplementary Figure S4). As expected from the low G6P pool, the SgrS induction in the *csrA51* mutant is prevented by *pfkA* overexpression (Figure 6D). Moreover, the overexpression did not prevent glycogen accumulation (Figure 6E). Finally, overexpression of *pfkA* moderately but significantly increased the growth rate in the *csrA51* strain (Figure 6E). Taking together, these results confirm PfkA has a most important target of the CSR system in the central carbon metabolism.

DISCUSSION

The present work reveals the major role of post-transcriptional regulations in the control of the central carbon metabolism of *E. coli*. The multi-level analysis and data integration demonstrate that the post-transcriptional regulatory system CSR strongly controls the upper part of the glycolysis. Attenuation of CsrA activity results in a decrease in most glycolytic activities, especially in the phosphofructokinase activity. This was shown to lead to an accumulation of upstream metabolites and hence to a hexose phosphate stress. The consequences are dramatic for the cell growth capacity, explaining the essentiality of the CSR system on glucose.

Influence of the CSR system over the CCM has already been reported in the literature (McKee et al, 2012; Revelles et al, 2013 ; Sabnis et al, 1995; Timmermans and Van Melderen, 2010). However, the information was limited to one level of observation (activities in Sabnis

et al, 1995, proteomic in McKee et al, 2012, fluxes in Revelles et al, 2013). Besides, the medium and strains were very different from one paper to another, making comparison very awkward (Kornberg rich medium and model strain BW3414 in Sabnis et al, 1995, MOPS-based medium and industrial strain BLR in McKee et al, 2012, M9 medium and strain Nissle 1917 belonging to the phylogenetic group B2 in Revelles et al, 2013). Consequently, the problem of conditions standardization could seriously compromised the comparison between works. So it is a strength of this paper to have explored for the first time the influence of CSR on gene expression, enzyme activities, metabolite pools and fluxes of the model bacterium *E. coli* MG1655. It confirms that the CSR system controls several pathways of the CCM (glycogenesis, glycolysis, gluconeogenesis, TCA cycle and acetate metabolism). However, the multi-level investigation also allowed highlighting that CSR control is largely exerted at the gene expression level with repercussions on enzyme activities and fluxes distribution. Analysis of the influence of the growth rate also demonstrated that some previously identified targets (like Pyk or Pck) are side effects of the CSR impact on *E. coli* growth. This permitted to refine the targets of CSR in the CCM in the upper glycolysis and glycogenesis. This finding was corroborated by the accumulation of metabolites in this pathway for the *csrA51* mutant. Very interestingly, these five first glycolytic steps displayed a coherent decrease in their gene expressions, enzymatic activities, and flux ratios in the *csrA51* strain. This was underlined by the predominant hierarchical control of their glycolytic fluxes. Thus, these results strongly suggest that glycolytic enzymes are under coordinated regulation by CsrA.

CsrA has been reported to be essential for *E. coli* growth on glycolytic substrates because it over-accumulates glycogen (Timmermans and Van Melderen, 2009). We show here that attenuation of the essential CsrA post-transcriptional regulator creates a growth defect in presence of glucose in rich or minimal medium. This growth defect was not observed on all glycolytic substrates (i.e., not on fructose or fucose). In addition, the accumulation of glycogen was observed in the *csrA51* strain independently of the growth rate default. This suggests that glycogen accumulation is not the actual cause of its essentiality. The cause of CSR essentiality is more largely related to the upper part of glycolysis. Using systematic analysis of CCM components in the wild-type and *csrA51* strains, we discovered that most of the molecular

discrepancies between the two strains are indeed located in the close vicinity of the point of glucose entry into the central carbon metabolism.

The most down regulated enzyme of the glycolytic pathway was PfkA. Since substrates entering the CCM after this metabolic step are not associated with a *csrA51* growth defect, we hypothesized that down regulation of PfkA creates an engorgement of the metabolic fluxes in the first glycolytic reaction that could lead to the growth deficiency. This hypothesis was supported by the observed higher pools of F6P and S7P (i.e. the two PfkA substrates; Nakahigashi et al, 2009). Restoring a wild-type level of PfkA in the *csrA51* mutant prevents these metabolites accumulation and partially restores the growth rate. From all these elements, we conclude that PfkA plays a major role in the *csrA51* phenotype. However, all the consequences of the *csrA51* mutation on the CCM cannot be mediated through PfkA down-regulation only. First, the *pfkA* deletion does not entirely prevent growth on glucose minimal medium as observed in a strain in which *csrA* is deleted (Nakahigashi et al, 2009; Timmermans and Van Melderen, 2009). Second, restoring the WT level of *pfkA* expression did not entirely restore a WT growth rate in the *csrA51* strain. The glucose-6-phosphate isomerase Pgi could be another target of interest here. However, this is contested by the equal accumulation of both its substrate and product in the *csrA51* strain (i.e. G6P and F6P), and by the mutant growth defect on N-acetyl-glucosamine (whose consumption is independent of Pgi), even when PfkA was restored to its wild-type level. Thus, the perturbations in the CCM metabolite pools of the *csrA51* strain originated not only in the PfkA defect, but also in the pleiotropic impact of CSR on glycolysis. Glycolytic flux control is known to be shared among its enzymes in microorganisms (Smallbone et al, 2013). This explains why the influence of the CSR system is so dramatic, since it controls the expression of most of the glycolytic enzymes conjointly, among which PFK appears to be the most affected metabolic step.

An important metabolic consequence of the reduced glycolytic fluxes is the accumulation of sugar phosphates G6P and F6P. F6P and S7P were reported to accumulate in the *csrA51* mutant of the Nissle 1917 background, but not G6P (Revelles *et al.*, 2013). Beside, the growth rate reduction in the Nissle 1917 *csrA51* mutant was 20 % versus 46 % in the MG1655. Thus, the growth defect on glucose is stronger in the MG1655 background. We

demonstrated that the accumulation of G6P and F6P triggers hexose phosphate stress as a feedback control in the *csrA51* strain through the expression of its characteristic marker SgrS (Rice and Vanderpool, 2011; Vanderpool, 2007). SgrS is known to reduce glucose transport by facilitating the degradation of the *ptsG* messenger. This was confirmed by our systemic analysis, which revealed reduced *ptsG* expression in the *csrA51* strain. Overexpression of *pfkA* in the *csrA51* strain alleviates the hexose phosphate stress and partially restores the growth. Thus, CsrA attenuation results in a sub-efficient glycolysis unable to absorb the G6P pool which trigger SgrS and reduced glucose entrance in the cell. On the basis of our results, we propose that *csrA* essentiality is due to its essential role to promote glycolysis. This suggests that the primary function of the CSR system in the CCM is to adjust the glycolytic activity to the carbon availability and cellular requirements. CSR was previously proposed to fine tune the stringent response (Edwards *et al.*, 2011a), which is also related to the growth rate response. This reinforces that one function of the CSR system is to coordinate the fine tuning of the glycolytic activities and the growth rate.

Post-transcriptional regulation of the central carbon metabolism has been almost ignored so far, but now appears to play a crucial role in the better understanding and handling of *E. coli*. One drawback in biotechnology approaches is the robustness of the CCM system (Sauer *et al.*, 1999). It was recently shown that *csrB* overexpression is valuable in biotechnologies since it produces low levels of fermentation products (McKee *et al.*, 2012). Here, we demonstrate the high potential of CSR mutants in biotechnologies since they allow reshaping of the CCM metabolic pools and fluxes. These new organizations offer many opportunities such as exploiting the larger pools of sugars phosphate to ensure the production of higher value sugars.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Strains

The strains used in this study were the wildtype strain *E. coli* K12-MG1655 and the previously constructed and validated *csrA51* strain corresponding to a partial deletion of the 10 last amino acids of the CsrA protein by using λ red system recombination (Esquerré *et al.*, (submitted)). *pfkA* overexpression in the wild-type or the *csrA51* background was achieved by cloning a 1963 pb fragment including *pfkA* and its promoter into the Kpn1-HindIII sites of a pUC19 plasmid. The fragment was amplified from the MG1655 genome:

5'Primer: ATTGAGGTACCGATGAGGAACGGAAGGAAGAAATTATTG and

3'Primer: TAACTAAGCTTGAATCACCACGTTATCACCAGTTT

Media and growth conditions

Bioreactor cultures were performed in 500 mL of M9 medium complemented with 2.7 g.L⁻¹ of *D*-glucose. The cultures were inoculated at an optical density of 0.2 after overnight preculture of the wild-type strain and a 48 h preculture of the *csrA51* strain. At least three independent replicates were made for each strain in the same conditions (stirring at 800 rpm, pH 7, 37 °C and air flow at 0.2 l.s⁻¹). These parameters were set and monitored using a Multifors bioreactor system (Infors, Switzerland). The percentages of CO₂ and O₂ in the gas output were determined using a Dycor ProLine Process Mass Spectrometer (Ametek, Delaware, USA). During the cultures, OD and extracellular metabolites were measured every 30 minutes. Several samples were taken for enzymatic assays, intracellular metabolites analysis and qPCR experimentations during the mid-exponential phase of the culture (OD= 1.5) for each biological replicate.

Growths in chemostat were performed in M9-Glucose using 0.5L Sartorius bioreactor controlled by a Biostat Qplus device as described in Esquerré *et al.*, 2014.

Cultures in LB or on the range of substrates as well as for *pfkA* overexpression were performed in a baffled shake flask at 37 °C in 50 mL of M9 glucose complemented with either

2.7 g.L⁻¹ D-Glucose, 2.7 g.L⁻¹ D-Fructose, 2.45 g.L⁻¹ L-Fucose or 2.5 g.L⁻¹ N-acetyl-(D)-Glucosamine.

Calculation of fermentation parameters

For all the cultures, different growth parameters were calculated during the exponential phase of growths. All these parameters remained constant during this growth phase.

- Maximum growth rate (h⁻¹): the maximum growth rate was calculated by determining the mean of all the instant growth rates acquired during the exponential phase thanks to the following equation:

$$\mu = \frac{dX}{dt} * \frac{1}{X}$$

where X is the biomass concentration in g_{DW}/L: X= OD * C_{OD/DW}

(C_{OD/DW} is the OD/dry weight correlation coefficient and is equal to 0.4 for the WT and 0.3 for the *csrA51* strain in the exponential phase)

- Maximum glucose uptake rate (mmol_{GLU}/h/g_{DW}): the maximum glucose uptake rate was calculated by determining the mean of all the instant glucose uptake rates acquired during the exponential phase by means of the following equation:

$$qS_{GLU} = \frac{dGLU}{dt} * \frac{1}{X}$$

- Acetate yield: acetate yield was calculated by determining the mean of all the instant acetate yields acquired during the exponential phase thanks to the following equation:

$$Y_{ACE/GLU} = \left\| \frac{\Delta ACE}{\Delta GLU} \right\|$$

- CO₂ production rate (mmol_{CO2}/h/g_{DW}): the CO₂ production rate was calculated by determining the mean of all the instant CO₂ production rates acquired during the exponential phase by means of the following equation:

$$qP_{CO_2} = \frac{1}{X} * (CO_{2OUT} - CO_{2IN})$$

with CO_{2OUT} (g_{CO2}/h/L) = $\frac{Q_{OUT} * F_{mCO_2} * M_{CO_2}}{V_{mCO_2} * V_f}$ and CO_{2IN} (g_{CO2}/h/L) = $\frac{Q_{IN} * F_{mCO_2} * M_{CO_2}}{V_{mCO_2} * V_f}$

(Q_{OUT} (g_{air}/h): air outflows, Q_{IN} (g_{air}/h): air inflows, F_{mCO_2} : molar fraction of CO_2 in the air, M_{CO_2} : CO_2 molar mass, V_{mCO_2} : CO_2 molar volume and V_f : medium volume)

Enzymatic assays

The equivalent of 40 mg of dried cells was sampled during bioreactor cultures to perform enzymatic assays. The cells were pelleted (10 min at 6,000 rpm at 4 °C) before being washed twice with 0.2% KCl (v/v) and re-suspended in 2 mL of a Tris-carballylic acid breaking buffer (Tris-tricarallylate pH 7.8, 2.7 M glycerol, 50 mM $MgCl_2$, 300 mM DTT). The cells were then mechanically broken by 6 beating cycles of 30 seconds each separated by 1 minute on ice using a MINI-BEADBEATER² (Biospec Products, Bartlesville, USA) and Sigma glass beads (0.6 g of glass beads for 1 mL of cells). The cell extract was isolated after centrifugation (13,200 rpm at 4 °C for 15 min) and used in the following hours for enzymatic assays. Eleven enzymatic activities were obtained by measuring the changes in NADH or NADPH concentration at 340 nm using the SPECTRAMax PLUS³⁸⁴ microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). All the reagents used were purchased from Sigma Aldrich (USA). The optical density was measured at 7 second intervals for 10 minutes with a 3 second shaking phase between readings. The assays were performed in a total volume of 200 μ l (including 10, 20 or 40 μ L of extract) at 37 °C, and the reactions were started by adding the substrate. Enzyme activities were determined from the linear part of the reaction. The total protein concentration in each extract was quantified by Bradford assay (Bio-Rad Protein assay, Bio-Rad, Germany) at 595 nm to obtain specific activities (μ mol.g_{prot}⁻¹.h⁻¹; Bradford, 1976). Phosphogluco-isomerase (Pgi) was assayed in the non-physiologic direction using Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.8), $MgCl_2$ (5 mM), NADP (5 mM), glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase (0.2 U) and fructose 6-phosphate (10 mM). Phosphofructokinase (Pfk), triosephosphate isomerase (Tpi) and enolase (Eno) assays were performed as described in Even et al (2001). Pyruvate kinase (Pyk) was measured using a modified method derived from Even et al (2001): fructose 1,6-diphosphate (3 mM) was added to the assay and GDP (30 mM) was replaced by ADP (30 mM). Acetyl-coenzyme A synthetase (Acs) was assayed as developed by Castano-Cerezo et al (2009); the isocitrate lyase (AceA) assay was performed as described in Van der Werf et al (1997). We also followed this author's protocol for the phosphoenolpyruvate

carboxykinase assay (PckA) but in a Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.8). The fructose bisphosphatase (Fbp) assay was adapted from Peng & Shimizu (2003) by replacing the buffer with a Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.8). The phosphoglucomutase (Pgm) assay was that of Joshi (1982) using 40 mM of the same Tris-HCl buffer. Glucose 1-phosphate adenylyltransferase (GlgC) was measured using phosphate buffer (100 mM, pH 7.8), MgSO₄ (5 mM), NADP (0.5 mM), fructose 1,6-diphosphate (10 mM), glucose 6-phosphate1-dehydrogenase (0.2 U), phosphoglucomutase (1 U) and ADP-glucose (8 mM). Malate synthase (AceB) was assayed in Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.8), MgSO₄ (5 mM), acetyl-CoA (4 mM), NAD (3 mM), malate dehydrogenase (4 U) and glyoxylate (4 mM).

Extracellular and intracellular metabolites

The extracellular metabolites were identified and quantified using H⁺ HPLC (Agilent Technologies 1200 Series HPLC and Aminex HPX-87H column for acid and sugar separation). The analysis was carried out at 48 °C using H₂SO₄ 5 mM as eluent.

Intracellular metabolites were sampled at the mid-exponential phase using the differential method of (Taymaz-Nikerel et al, 2009): 120 µL of broth or filtered culture (Sartolon polyamide 0.2 µm, Sartorius, Goettingen, Germany) were mixed with 1.25 mL of a quenching solution composed of 40% methanol, 40% acetonitrile and 20% water in a hemolysis tube. The tubes were stored at -20 °C until analysis. A total of 120 µL of a fully ¹³C-labeled cell extract were added to each tube as internal standard before the extracts were evaporated for five hours in a SC110A SpeedVac Plus (ThermoFischer, MA, USA). The pellet was then re-suspended in 120 µL of ultrapure water. Intracellular metabolites were quantified by high performance anion exchange chromatography (Dionex ICS 2000 system, CA, USA) coupled to a triple quadrupole QTrap 4000 mass spectrometer (AB Sciex, CA, USA). The signals were processed and quantified using Analyst software (Analyst Software, AB SCIEX, USA).

RT-PCR analysis

Gene expression levels were analyzed using Q-PCR in micro-Fluidigm or classical RT-PCR. In mid-exponential phase, the equivalent of 5 mg of cells (dry weight) was harvested and

directly flash-frozen in liquid nitrogen. RNA extraction was performed according to the TRIZOL method for *Escherichia coli* described in Esquerre et al (2013) and the concentration of RNA was determined using a Nanodrop® spectrophotometer. After a quality control by capillary electrophoresis (Bioanalyzer from Agilent, Santa Clara, California, USA) the samples were subjected to reverse transcription using the Superscript II Reverse transcriptase (Life Technology). The Q-PCR EvaGreen experiment (Mao et al, 2007) was performed on a Biomark 96.96 dynamic array (Fluidigm, San Francisco, California, USA). Ninety samples were tested against 33 pairs of designed primers (Table 3) in technical triplicate. An internal control of human DNA was used to check the efficiency and quality of the run. Briefly, the experiment was carried out in three steps. First, in each cDNA sample, targeted cDNA was amplified using the pool of primers and TaqMan® PreAmp Master Mix (Fluidigm, San Francisco, California, USA) with the following program: (i) 10 minutes at 95°C, (ii) 14 cycles of 15 seconds at 95 °C and 4 minutes at 60 °C. The samples were then treated with exonuclease Exo I (for 30 minutes at 37 °C for digestion and for 15 minutes at 80 °C for inactivation). Finally, the samples were added to a pre-mix (2X TaqMan Gene Expression Master Mix, 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent, 20X EvaGreen® and TE buffer) before being loaded into the macro-array. The sets of primers were loaded into the macro-array at a concentration of 20 µM. Control *idnT* values were used to normalize the data.

A classic RT-PCR was also used to study the SgrS expression level and to check for *pfkA* overexpression using the SYBR-Green based detection protocol (Life Technology), an ICycler real-time PCR detection system (Biorad) and “MyIQ” software (Biorad), as described in Enjalbert et al (2013).

Glycogen staining assays and intracellular glycogen quantification

Strains were grown overnight at 37 °C in 50 ml M9 media containing either 2.7 g.L⁻¹ D-Glucose, 2.7 g.L⁻¹ D-Fructose, 2.45 g.L⁻¹ L-Fucose or 2.5 g.L⁻¹ N-acetyl-(D)-Glucosamine. The intracellular glycogen content of both *csrA51* and the wild-type strains was quantified in mid-exponential growth. The experiments were performed in biological and technical duplicate. The quantification was done as described in Parrou & François (1997). Briefly, the cells were lysed to extract the glycogen which was then hydrolyzed by amyloglucosidase into glucose

subunits. The glucose sub-units were then quantified using a glucose oxidase coupled to the colorimetric reagent o-dianisidine dihydrochloride.

Flux variability analysis

A slightly modified version of the genome-scale reconstruction iAF1260-flux2 of *Escherichia coli* was used for all simulations (Feist et al, 2007; see Supplementary Table S2). These were performed using the COBRAv2 Toolbox with GLPK as linear programming solver (Schellenberger et al, 2011). We used chemostat data for wild-type and *csrA51 E. coli* strains growing aerobically on glucose (Esquerré *et al.*, in submission) to estimate a unique set of growth associated maintenance (GAM) and non-growth associated maintenance (NGAM) fluxes for both strains. Using flux balance analysis and the 'core' biomass objective function, we found that a GAM value of 120 mmol ATP.gDW⁻¹.h⁻¹ (higher than the one used in Feist et al (2007)) and the default NGAM value of 6.75 mmol ATP.gDW⁻¹.h⁻¹ best fitted the data. Additional constraints common to both strains were defined. The lower bound of exchange fluxes was set to zero, except for components of the *in silico* growth medium (water, vitamin, salt, traces, and glucose carbon source), which were left unconstrained. The upper bound of exchange fluxes was set to zero for fermentation products, which, except for the acetate and carbon dioxide, were not detected in the external medium in our experiments. Culture oxygenation being maximal in our experiments, an unlimited oxygen uptake flux was allowed ($v_{O_2}^I = -1000$ mmol.gDW⁻¹.h⁻¹). Forty reversible reactions were constrained by literature data and thermodynamic analysis (see Supplementary Table S2 for the list of constraints). Thermodynamic constraints were determined by computing the Gibbs free energy of reaction (Δ_rG) using the group contribution theory implemented in eQuilibrator (Flamholz et al, 2012), for an aqueous solution at pH 7, temperature equal to 298.15 K, and ionic strength equal to 0.25 M (Fleming et al, 2009; Henry et al, 2007). Molecular concentrations were set at their value determined experimentally when available, or varied within a range of plausible values. The direction of reactions with a computed Δ_rG far from zero was constrained.

Flux variability analysis of both strains was performed to determine alternate intracellular flux distributions that minimize the discrepancy between prediction and

measurements (growth rates, uptake and secretion rates at steady state growth on glucose) as the same objective (Mahadevan & Schilling, 2003):

$$\begin{aligned} \min \sum_{j=1}^p |v_j - u_j^M| \text{ subject to:} \\ Nv = 0, \\ v^l \leq v \leq v^u, \end{aligned}$$

where v^l and v^u denote the lower and upper bounds of reaction fluxes and v_j^M , the set of p measured fluxes. Similarly to what was done in Lee et al (2012), the above optimization problem was reformulated as a linear programming problem:

$$\begin{aligned} \min \sum_{j=1}^p (u_j^+ + u_j^-) \text{ subject to:} \\ Nv = 0, \\ v^l \leq v \leq v^u, \\ v_j - u_j^+ + u_j^- = v_j^M, \text{ for all } j = 1, \dots, p, \\ u^+, u^- \geq 0. \end{aligned}$$

Solving this optimization problem allowed us to obtain lower and upper bounds for reaction fluxes that are consistent with the measured growth rate and exchange rates.

Hierarchical regulation analysis

In HRA, the rate of an enzyme-catalyzed reaction at steady state is written $J = v(e,x,K) = f(e) \cdot g(x,K)$, where v is the rate, e is the enzyme concentration, x is the vector of metabolite concentrations (substrates, products, and effectors), and K is the vector of dissociation constants. A logarithmic transformation dissects the flux into two terms, one depending on the concentration of enzymes and the other on the concentration of metabolites: $\log J = \log f(e) + \log g(x,K)$. The change in the flux between the wild-type and *csrA51* strains is written $\Delta \log J = \Delta \log f(e) + \Delta \log g(x,K)$. The contribution of gene expression and metabolic control to the change in flux is quantified by dividing the latter expression as follows: $\frac{\Delta \log J}{\Delta \log J} = \frac{\Delta \log f(e)}{\Delta \log J} + \frac{\Delta \log g(x,K)}{\Delta \log J} = \rho_h + \rho_m = 1$, where ρ_h is the hierarchical regulation coefficient and ρ_m is the metabolic regulation coefficient. In our conditions, $f(e)$ corresponds to the measured specific

activity SA of the enzyme. We can therefore determine ρ_h directly from the experimental data and the fluxes $\rho_h = \Delta \log SA / \Delta \log J$, and deduce $\rho_m = 1 - \rho_h$. Hierarchical and metabolic regulation coefficients were then calculated from the enzyme specific activities SA and the computed fluxes J . Rather than propagating uncertainties in the computation, we took into account the variability in the enzyme activities and the uncertainty in the fluxes by computing the coefficients in the following way. For each replicate of specific activity (SA), $SA^w = \{SA_1^w, \dots, SA_i^w, \dots, SA_n^w\}$ for the wild-type strain and $SA^A = \{SA_1^A, \dots, SA_j^A, \dots, SA_p^A\}$ for the *csrA51* strain, and for each flux $J_w \in [J_{lw}^w, J_{uw}^w]$ and $J_A \in [J_{lA}^A, J_{uA}^A]$ for the wild-type and *csrA51* strains respectively, we determined a hierarchical regulation coefficient $\rho_h = \frac{\log SA_i^A - \log SA_j^w}{\log J_k^A - \log J_m^w}$ for $i=\{1, \dots, n\}$, $j=\{1, \dots, p\}$, $k=\{lw, uw\}$, and $m=\{lA, uA\}$, and a metabolic regulation coefficient $\rho_m = 1 - \rho_h$. Depending on the number of replicates in each strain, we obtained between 35 and 256 coefficients for each reaction (see Supplementary Figure S3 for an example).

We analyzed the statistical distribution of the regulation coefficients for each reaction by means of box plots (Figure 7). Boxes represent the interquartile range (IQR) between the first and third quartiles and the line inside represents the median. Whiskers denote the lowest and highest values within $1.5 \times$ IQR from the first and third quartiles, respectively (corresponding to $\pm 2.7\sigma$ and 99.3% coverage of the data for a normal distribution). Wilcoxon signed-rank tests with the Matlab `signrank` function (Mathworks) were applied to the coefficients ρ_h and ρ_m to significantly assess the type of regulation. This non-parametric test does not require any assumptions about the distribution of the two related populations of coefficients, which are obtained from the same measurements. Purely hierarchical (or metabolic) regulation was checked by testing the null hypothesis that the median difference between the populations ($\rho_h - 1$) and ρ_m (or between ρ_h and $(\rho_m - 1)$) is zero at the 5% significance level. We tested the null hypothesis that the median difference between ρ_h and ρ_m is zero in the case of shared control of the reaction.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alessandra Fontana, Andrea Belluati and Sophie Mondeil for their worthy contribution to this work and Hidde de Jong and Eugenio Cinquemani for fruitful discussions. This work was supported by the *Institut National de la Recherche Agronomique* (Department ‘Microbiology of the Food Chain’) and the *Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique* from which MM received a doctoral fellowship. MetaToul (Metabolomics & Fluxomics Facilities, Toulouse, France, www.metatoul.fr) and its staff members (Lara Gales and Lindsey Peyriga) are gratefully acknowledged for access to NMR or mass spectrometry facilities. MetaToul is part of the national infrastructure MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 (The French National infrastructure for metabolomics and fluxomics, www.metabohub.fr). Gene expression data were obtained with the support of the Genomic and Transcriptomic Platform of Auzeville.

REFERENCES

- Adams, J.L., and McLean, R.J. (1999). Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 4285–4287.
- Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, S.D. (2000). Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion Genes by *csrA*. *Infect. Immun.* *68*, 6790–6797.
- Castano-Cerezo, S., Pastor, J.M., Renilla, S., Bernal, V., Iborra, J.L., and Canovas, M. (2009). An insight into the role of phosphotransacetylase (*pta*) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* *8*, 54.
- Duss, O., Michel, E., Diarra dit Konte, N., Schubert, M., and Allain, F.H.-T. (2014). Molecular basis for the wide range of affinity found in Csr/Rsm protein-RNA recognition. *Nucleic Acids Res.* *42*, 5332–5346.
- Edwards, A.N., Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Mercante, J.W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M.I., Fields, J.A., Thompson, S.A., Georgellis, D., *et al.* (2011). Circuitry Linking the Csr and Stringent Response Global Regulatory Systems. *Mol. Microbiol.* *80*, 1561–1580.
- Enjalbert, B., Jourdan, F., and Portais, J.-C. (2011). Intuitive visualization and analysis of multi-omics data and application to *Escherichia coli* carbon metabolism. *PLoS One* *6*, e21318.
- Enjalbert, B., Letisse, F., and Portais, J.-C. (2013). Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*. *Metabolites* *3*, 820–837.

- Esquerré, T., Laguerre, S., Turlan, C., Carpousis, A.J., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2014). Dual role of transcription and transcript stability in the regulation of gene expression in *Escherichia coli* cells cultured on glucose at different growth rates. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2460–2472.
- Esquerre, T., Turlan, C., Bouvier, M., Carpousis, A.J., Coccagn-Bousquet, M., Girbal, L. Genome-wide extent of the Csr system on mRNA expression and stability in *Escherichia coli*. **(Submitted)**
- van Eunen, K., Rossell, S., Bouwman, J., Westerhoff, H.V., and Bakker, B.M. (2011). Quantitative analysis of flux regulation through hierarchical regulation analysis. *Methods Enzymol.* *500*, 571–595.
- Even, S., Lindley, N.D., and Coccagn-Bousquet, M. (2001). Molecular Physiology of Sugar Catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *J. Bacteriol.* *183*, 3817–3824.
- Feist, A.M., Henry, C.S., Reed, J.L., Krummenacker, M., Joyce, A.R., Karp, P.D., Broadbelt, L.J., Hatzimanikatis, V., and Palsson, B.Ø. (2007). A genome-scale metabolic reconstruction for *Escherichia coli* K-12 MG1655 that accounts for 1260 ORFs and thermodynamic information. *Mol. Syst. Biol.* *3*.
- Fischer, E., and Sauer, U. (2003). Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *Eur. J. Biochem.* *270*, 880–891.
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W., and Milo, R. (2013). Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 10039–10044.
- Fleming, R.M.T., Thiele, I., and Nasheuer, H.P. (2009). Quantitative assignment of reaction directionality in constraint-based models of metabolism: application to *Escherichia coli*. *Biophys. Chem.* *145*, 47–56.
- Heinemann, M., and Sauer, U. (2010). Systems biology of microbial metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 337–343.
- Henry, C.S., Broadbelt, L.J., and Hatzimanikatis, V. (2007). Thermodynamics-Based Metabolic Flux Analysis. *Biophys. J.* *92*, 1792–1805.
- Holms, H. (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* *19*, 85–116.
- Joshi, J.G. (1982). Phosphoglucosmutase from yeast. *Methods Enzymol.* *89 Pt D*, 599–605.
- Kotte, O., Zaugg, J.B., and Heinemann, M. (2010). Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 355.
- Kuile, B.H. ter, and Westerhoff, H.V. (2001). Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett.* *500*, 169–171.
- Lee, D., Smallbone, K., Dunn, W.B., Murabito, E., Winder, C.L., Kell, D.B., Mendes, P., and Swainston, N. (2012). Improving metabolic flux predictions using absolute gene expression data. *BMC Syst. Biol.* *6*, 73.
- Liu, M.Y., Yang, H., and Romeo, T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* *177*, 2663–2672.

- Mahadevan, R., and Schilling, C.H. (2003). The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab. Eng.* 5, 264–276.
- Mao, F., Leung, W.-Y., and Xin, X. (2007). Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol.* 7, 76.
- McKee, A.E., Rutherford, B.J., Chivian, D.C., Baidoo, E.K., Juminaga, D., Kuo, D., Benke, P.I., Dietrich, J.A., Ma, S.M., Arkin, A.P., *et al.* (2012). Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* 11, 79.
- Morita, T., El-Kazzaz, W., Tanaka, Y., Inada, T., and Aiba, H. (2003). Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 278, 15608–15614.
- Nakahigashi, K., Toya, Y., Ishii, N., Soga, T., Hasegawa, M., Watanabe, H., Takai, Y., Honma, M., Mori, H., and Tomita, M. (2009). Systematic phenome analysis of *Escherichia coli* multiple-knockout mutants reveals hidden reactions in central carbon metabolism. *Mol. Syst. Biol.* 5, 306.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., *et al.* (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* 334, 982–986.
- Parrou, J.L., and François, J. (1997). A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* 248, 186–188.
- Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Babitzke, P., and Romeo, T. (2013). Dual Posttranscriptional Regulation via a Cofactor-Responsive mRNA Leader. *J. Mol. Biol.* 425, 3662–3677.
- Peng, L., and Shimizu, K. (2003). Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 163–178.
- Revelles, O., Millard, P., Nougayrède, J.-P., Dobrindt, U., Oswald, E., Létisse, F., and Portais, J.-C. (2013). The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *PLoS One* 8, e66386.
- Rice, J.B., and Vanderpool, C.K. (2011). The small RNA SgrS controls sugar-phosphate accumulation by regulating multiple PTS genes. *Nucleic Acids Res.* 39, 3806–3819.
- Romeo, T., and Gong, M. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* 175, 5740–5741.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* 175, 4744–4755.
- Romeo, T., Vakulskas, C.A., and Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.* 15, 313–324.
- Sabnis, N.A., Yang, H., and Romeo, T. (1995). Pleiotropic Regulation of Central Carbohydrate Metabolism in *Escherichia coli* via the Gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* 270, 29096–29104.

- Sabourin, D., and Beckwith, J. (1975). Deletion of the *Escherichia coli* *crp* gene. *J. Bacteriol.* *122*, 338–340.
- Sauer, U., Lasko, D.R., Fiaux, J., Hochuli, M., Glaser, R., Szyperski, T., Wüthrich, K., and Bailey, J.E. (1999). Metabolic Flux Ratio Analysis of Genetic and Environmental Modulations of *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism. *J. Bacteriol.* *181*, 6679–6688.
- Schellenberger, J., Que, R., Fleming, R.M.T., Thiele, I., Orth, J.D., Feist, A.M., Zielinski, D.C., Bordbar, A., Lewis, N.E., Rahmanian, S., *et al.* (2011). Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0. *Nat Protoc.* *6*, 1290–1307.
- Seyll, E., and Van Melderren, L. (2013). The Ribonucleoprotein Csr Network. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22117–22131.
- Shimizu, K. (2013). Metabolic Regulation of a Bacterial Cell System with Emphasis on *Escherichia coli* Metabolism. *Int. Sch. Res. Not.* *2013*, e645983.
- Smallbone, K., Messiha, H.L., Carroll, K.M., Winder, C.L., Malys, N., Dunn, W.B., Murabito, E., Swainston, N., Dada, J.O., Khan, F., *et al.* (2013). A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterisation of all its enzymes. *FEBS Lett.* *587*, 2832–2841.
- Taymaz-Nikerel, H., de Mey, M., Ras, C., Pierick, A. ten, Seifar, R.M., van Dam, J.C., Heijnen, J.J., and van Gulik, W.M. (2009). Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* *386*, 9–19.
- Timmermans, J., and Melderren, L.V. (2009). Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *191*, 1722–1724.
- Timmermans, J., and Melderren, L.V. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 2897–2908.
- Vakulskas, C.A., Potts, A.H., Babitzke, P., Ahmer, B.M.M., and Romeo, T. (2015). Regulation of Bacterial Virulence by Csr (Rsm) Systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *79*, 193–224.
- Vanderpool, C.K. (2007). Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 146–151.
- Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, A.J., and Romeo, T. (2000). Global Regulatory Mutations in *csrA* and *rpoS* Cause Severe Central Carbon Stress in *Escherichia coli* in the Presence of Acetate. *J. Bacteriol.* *182*, 1632–1640.
- van der Werf, M.J., Overkamp, K.M., Muilwijk, B., Coulier, L., and Hankemeier, T. (2007). Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolome coverage. *Anal. Biochem.* *370*, 17–25.
- Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2013). CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol. Microbiol.* *87*, 851–866.
- Yang, H., Liu, M.Y., and Romeo, T. (1996). Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J. Bacteriol.* *178*, 1012–1017.

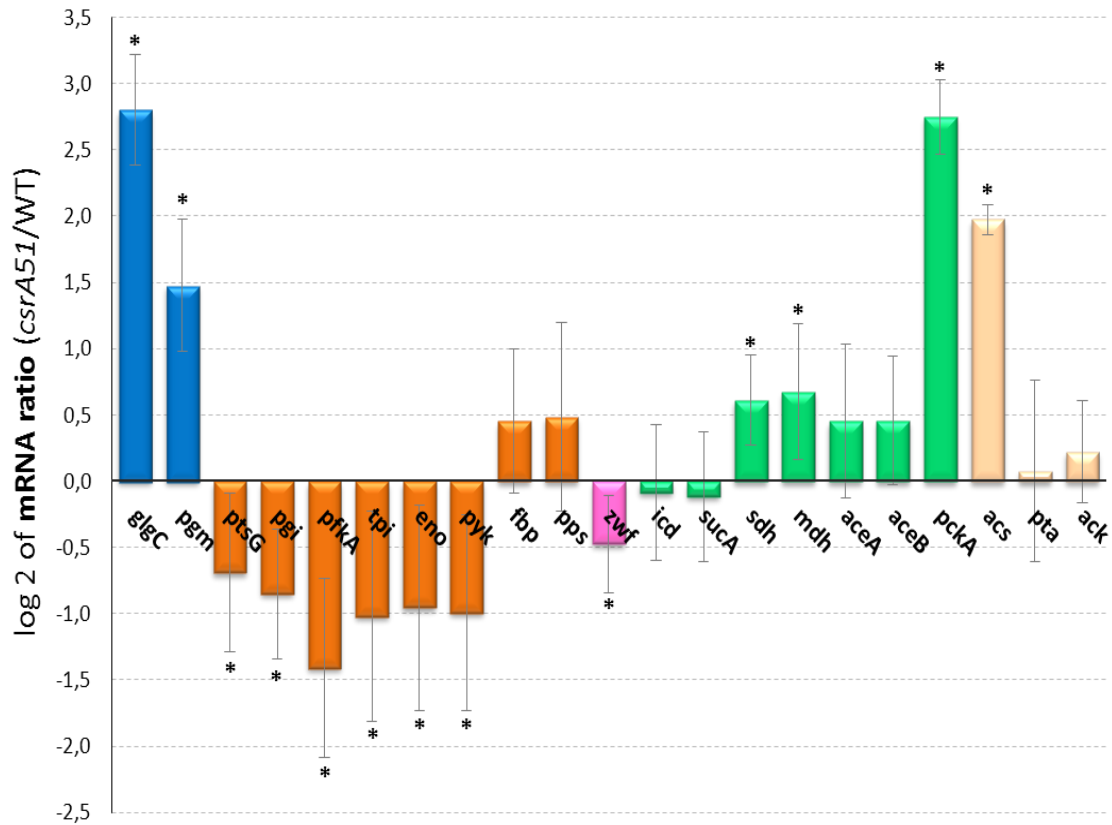


Figure 1: Comparison of mRNA contents in the CCM between the wild-type and the *csrA51* strains. mRNA data are issued from three independent replicates for the *csrA51* strain and its isogenic wild-type (means±SD). The displayed values correspond to the log₂ of the ratio of the *csrA51* strain to its isogenic wild-type (with propagation of uncertainty). The asterisk (*) represents significant ratio (pvalue <5% determined by t-test). The color code matches the entity pathway (blue for the glycogen synthesis pathway, orange for the glycolysis pathway and gluconeogenesis pathways, pink for the pentose phosphate pathway, green for the TCA cycle, and light brown for acetate metabolism pathway).

glgC: glucose 1-phosphate adenytransferase (EG10379); *pgm*: phosphoglucomutase (EG12144); *ptsG*: glucose PTS permease PtsG subunit (EG10787); *pgi*: phosphoglucose isomerase (EG10702); *pfkA*: phosphofructokinase A (EG10699); *tpi*: triose phosphate isomerase (ECK3911); *eno*: enolase (EG10258); *pyk*: puruvate kinase (ECK1672); *fbp*: fructose biphosphatase (ECK4227); *pps*: phosphoenolpyruvate synthetase (ECK1700); *zwf*: glucose 6-phosphate-1 dehydrogenase (EG11221); *icd*: isocitrate dehydrogenase (EG10489); *suca*: 2-oxoglutarate decarboxylase (ECK0714); *sdh*: succinate dehydrogenase (ECK0710); *mdh*: malate dehydrogenase (ECK3225); *aceA*: isocitrate lyase (ECK4007); *aceB*: malate synthase (ECK4006); *pck*: phosphoenolpyruvate carboxykinase (EG10688); *acs*: acetyl-coenzymeA synthetase (EG11448); *pta*: phosphate acetyltransferase (EG20173); *ackA*: acetate kinase (EG10027).

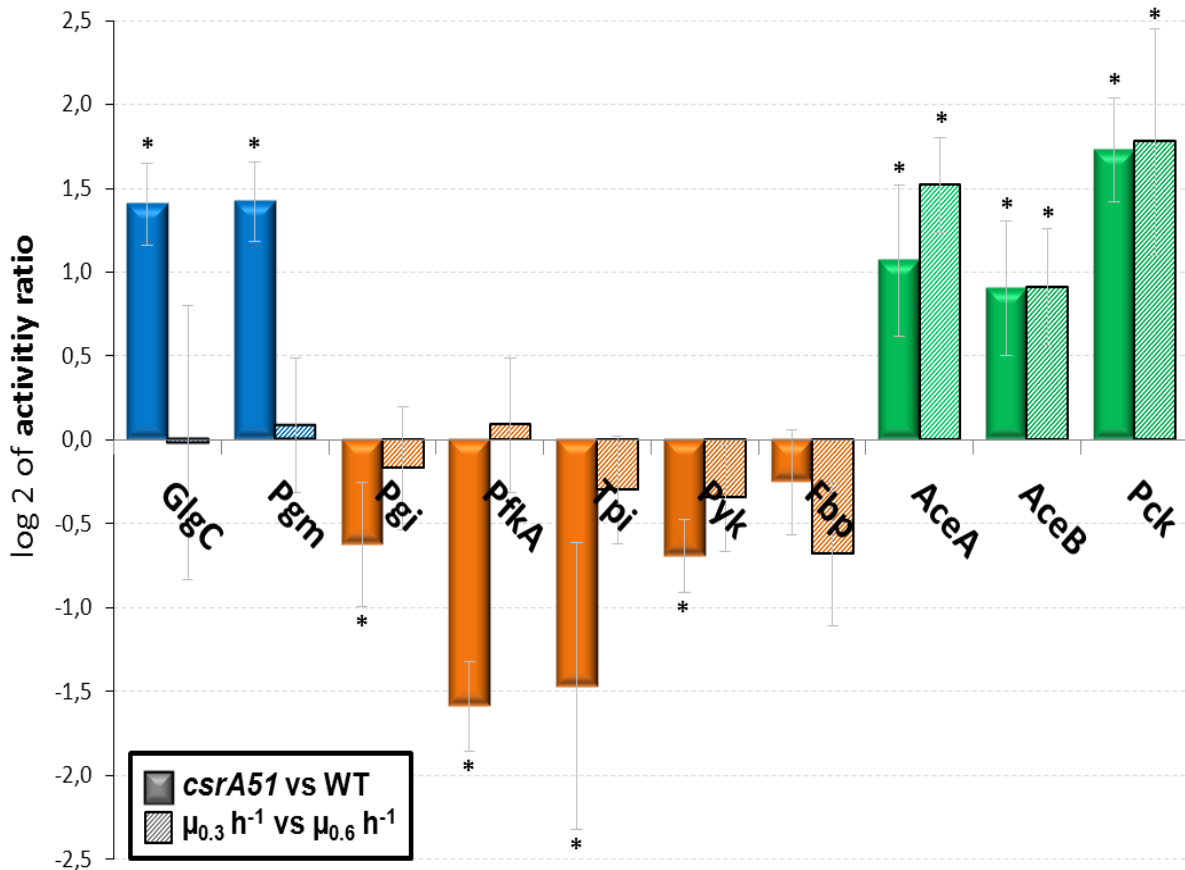


Figure 2: Comparison of enzymatic levels in the CCM between the wild-type and the *csrA51* strains. Enzymatic levels are issued from three independent replicates for the *csrA51* strain and its isogenic wild-type (means±SD). The displayed values correspond to the log₂ of the ratio of the *csrA51* strain to its isogenic wild-type (with propagation of uncertainty). Hatched columns represent log₂ of ratio between enzymatic levels in the wild-type growing at $\mu = 0.3$ (chemostatic cultures) to the same strain at $\mu = 0.6$ (batch cultures). The asterisk (*) represents significant ratio (pvalue <5% determined by t-test). The color code matches the entity pathway (blue for the glycogen synthesis pathway, orange for the glycolysis pathway and gluconeogenesis pathways and green for the TCA cycle-related enzymes). GlgC: glucose 1-phosphate adenytransferase; Pgm: phosphoglucomutase; Pgi: phosphoglucose isomerase; PfkA: phosphofruktokinase A; Tpi: triose phosphate isomerase; Pyk: puruvate kinase; Fbp: fructose biphosphatase; AceA: isocitrate lyase; AceB: malate synthase; Pck: phosphoenolpyruvate carboxykinase.

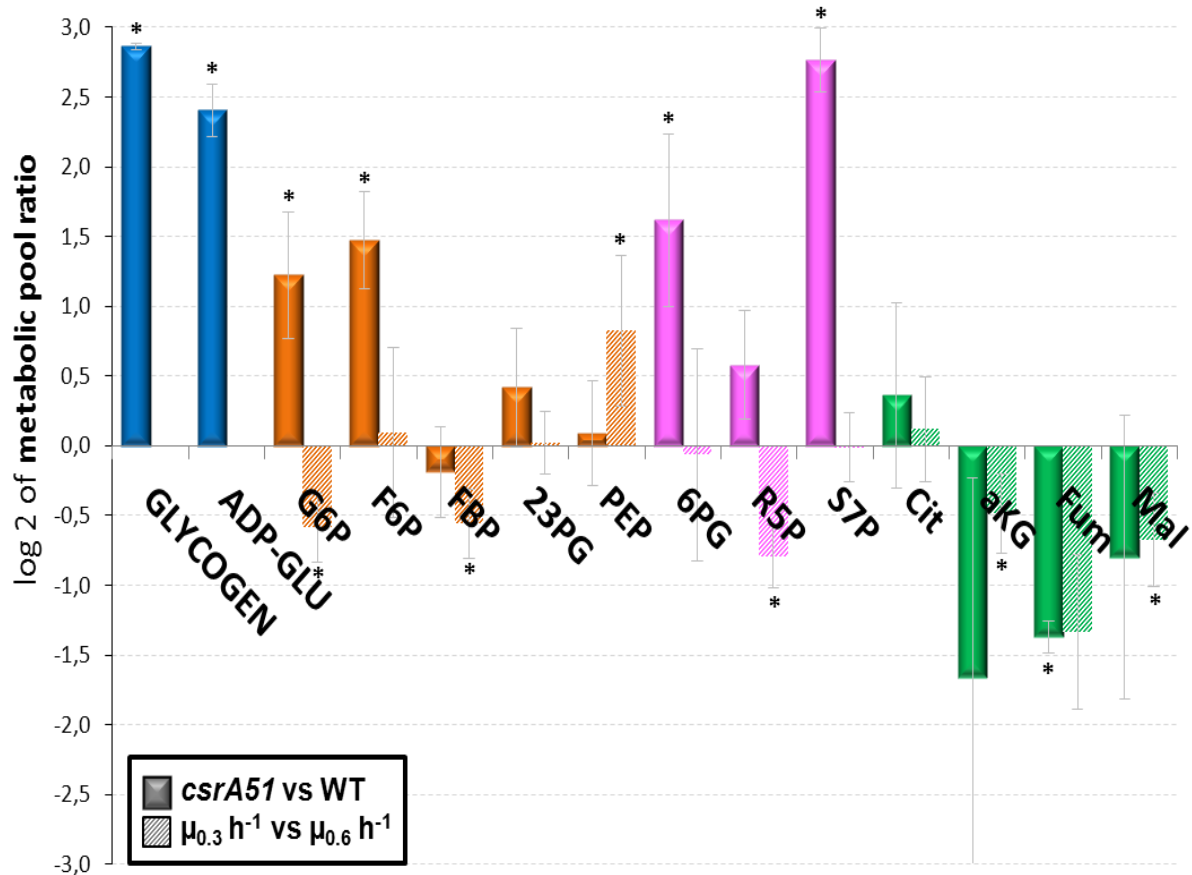


Figure 3: Comparison of metabolite concentrations in the CCM between the wild-type and the *csrA51* strains. Metabolic concentrations are issued from three independent replicates for the *csrA51* strain and its isogenic wild-type (means \pm SD). The displayed values correspond to the log2 of the ratio of the *csrA51* strain to its isogenic wild-type (with propagation of uncertainty). Hatched columns represent log2 of ratio between metabolite concentrations in the wild-type growing at $\mu = 0.3$ (chemostatic cultures) to the same strain at $\mu = 0.6$ (batch cultures). The asterisk (*) represents significant ratio (pvalue <5% determined by t-test). The color code matches the entity pathway (blue for the glycogen synthesis pathway, orange for the glycolysis pathway and gluconeogenesis pathways, pink for the pentose phosphate pathway and green for TCA cycle-related metabolites). G6P: glucose 6-phosphate; F6P: fructose 6-phosphate; FBP: fructose 1,6-biphosphate; 23PG: 3-phospho glycerate and 2-phospho glycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; 6PG: 6-phospho glucono-1,5-lactone; R5P: ribose 5-phosphate and ribulose 5-phosphate; S7P: sedoheptulose 7-phosphate; cit: citrate; aKG: α -keto glutarate; Fum: fumarate; Mal: malate.

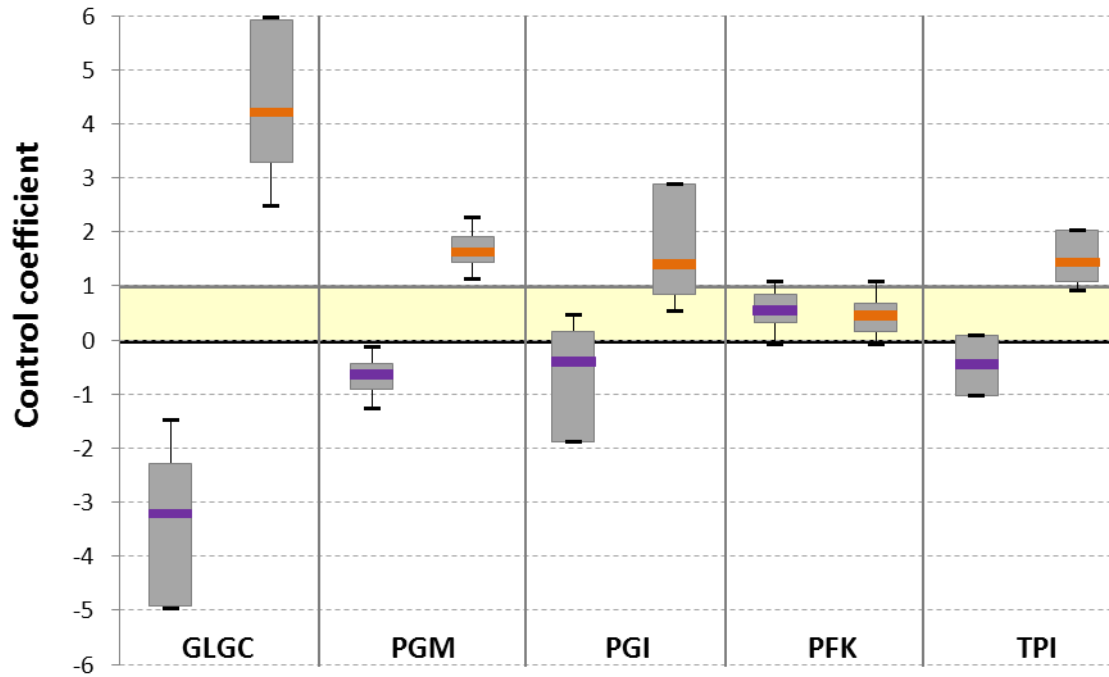
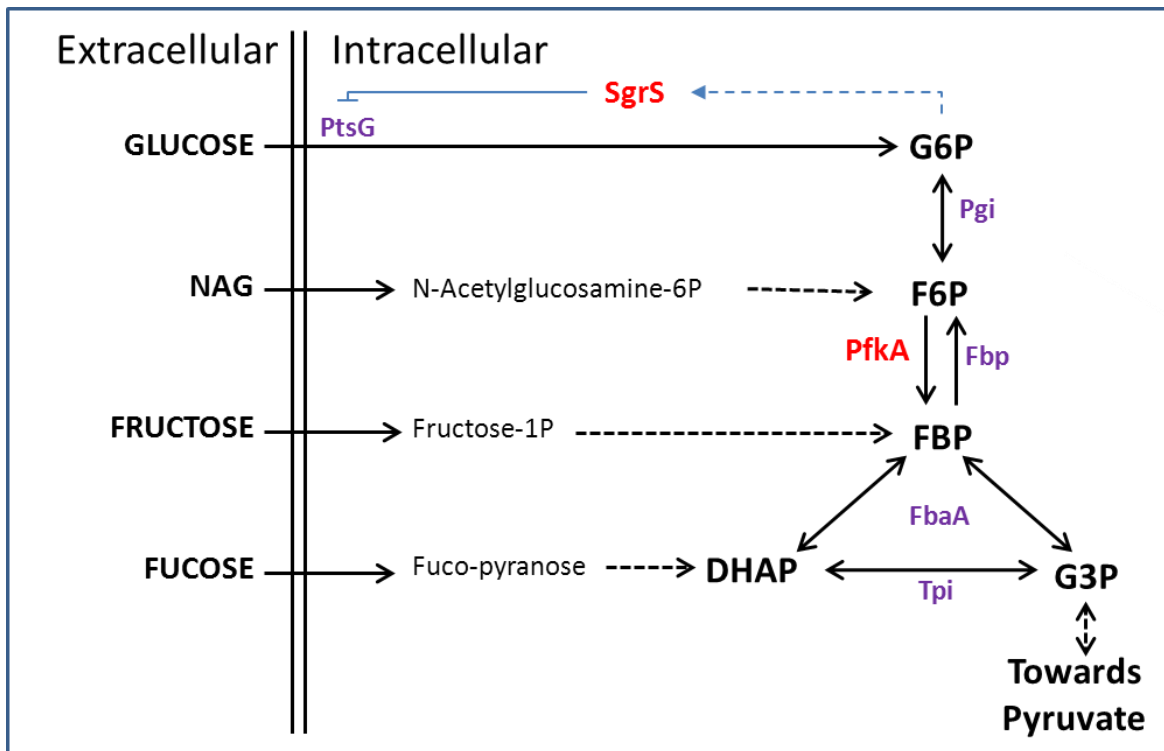


Figure 4: Regulation of metabolic fluxes between the *csrA51* and WT strains. Boxplots of the hierarchical and metabolic regulation coefficients associated to flux variation between the *csrA51* strain and the wild-type strain. Hierarchical and metabolic regulation coefficients were calculated from the different replicates of the measured enzyme specific activities and the flux bounds for each reaction (see Experimental Procedures section for details). Boxes represent the interquartile range (IQR) between the first and third quartiles. Whiskers denote the lowest and highest values within $1.5 \times \text{IQR}$ from the first and third quartiles. Purple: median hierarchical coefficient. Orange: median metabolic coefficient.

5A.



5B.

Substrate	μ WT h ⁻¹	μ <i>csrA51</i> h ⁻¹	μ Ratio	Glycogen WT $\mu_{gluc} \cdot gDW^{-1}$	Glycogen <i>csrA51</i> $\mu_{gluc} \cdot gDW^{-1}$	Glycogen Ratio	<i>sgrS</i> WT AU	<i>sgrS</i> <i>csrA51</i> AU	<i>sgrS</i> Ratio
Glucose	0.57 ±0.01	0.32 ±0.01	0.56 ±0.02	0.037 ±0.003	0.252 ±0.011	6,80 ±0.64	28 ±7,3	136,9 ±18,7	4,9 ±1,4
NAG	0.53 ±0.02	0.34 ±0.01	0.64 ±0.03	0.022 ±0.012	0.318 ±0.033	14,20 ±7,32	27,3 ±2,7	192,4 ±23	7 ±1,1
Fructose	0.38 ±0.01	0.37 ±0.02	0.98 ±0.06	0.013 ±0,001	0.217 ±0.065	16.31 ±5.08	17,3 ±5,1	19,5 ±0,02	1,1 ±0,4
Fucose	0.43 ±0.02	0.43 ±0.01	0.99 ±0.05	0.017 ±0.004	0.287 ±0.065	16.89 ±5.77	18,3 ±1,5	20 ±13,5	1,1 ±0,7

Figure 5: Properties of *E. coli* grown on a variety of glycolytic substrates. 5A: Simplified representation of the metabolic pathways and point of entry in the CCM for four glycolytic substrates. **5B:** Growth rates, glycogen contents and SgrS level of expression of for the wild-type and the *csrA51* strains on a variety of glycolytic substrates. Each growth rate, glycogen content and SgrS levels is issued from the mean±SD of three independent biological replicates. The ratio $r = csrA51/WT$ is given for each substrate.

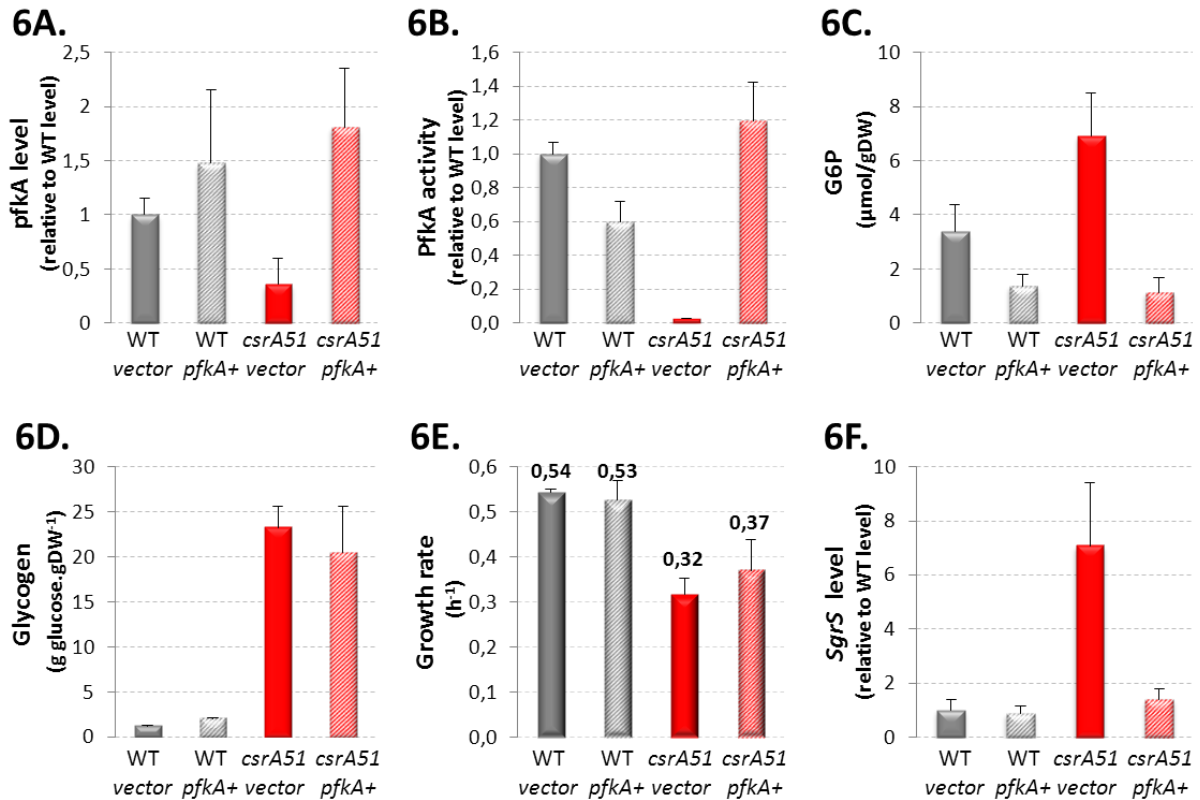


Figure 6. Overproduction of *pfkA* in the wild-type and *csrA51* strains. Wild-type or *csrA51* strains were transformed by the empty vector or the vector carrying the *pfkA* gene (“*pfkA+*”). **6A.** *pfkA* mRNA levels in the four strains. **6B.** PfkA specific activities in the four strains. **6C.** G6P concentration in the four strains **6D.** SgrS ncRNA levels in the four strains. **6E.** Glycogen content in the four strains. **6F.** Growth rates of the four strains. Each value is issued from the mean±SD of three independent biological replicates. The asterisk (*) represents significant differences between the strain overexpressing *pfkA* and its control (pvalue <5% determined by t-test).

Table 1 : Comparison of metabolic fluxes determined by FVA.. A set of flux intervals was obtained for each strain from the integration of the three biological replicates (see Experimental Procedures for details). .

Medium	Parameter	WT	<i>csrA51</i>	Ratio
LB	Growth rate (h ⁻¹)	1.38 ±0.07	1.26 ±0.07	0.92
LB Glucose	Growth rate (h ⁻¹)	1.52 ±0.04	0.96 ±0.18	0.63
M9 Glucose	Growth rate (h ⁻¹)	0.57 ±0.02	0.31 ±0.02	0.54
	Glucose consumption rate (mmol _{GLC} ·h ⁻¹ ·g _{DW} ⁻¹)	8.4 ±0.1	3.5 ±0.3	0.42
	Acetate Yield (mmol _{ACE} /mmol _{GLC})	0.31 ±0.02	0.02 ±0.01	0.06
	Glycogen content (g _{glucose} ·g _{DW} ⁻¹)	0.037 ±0.003	0.252 ±0.011	6,8
	CO ₂ production rate (mmol _{CO₂} /h/g _{DW})	13.3 ±0.50	8.9 ±0.2	0.67

Table 2 : Macrophenotypic parameters for wild-type and *csrA51* strains during exponential growth.

GSP: Glycogen synthesis pathway; PPP: Pentose phosphate pathway, APP: Acetate production pathway

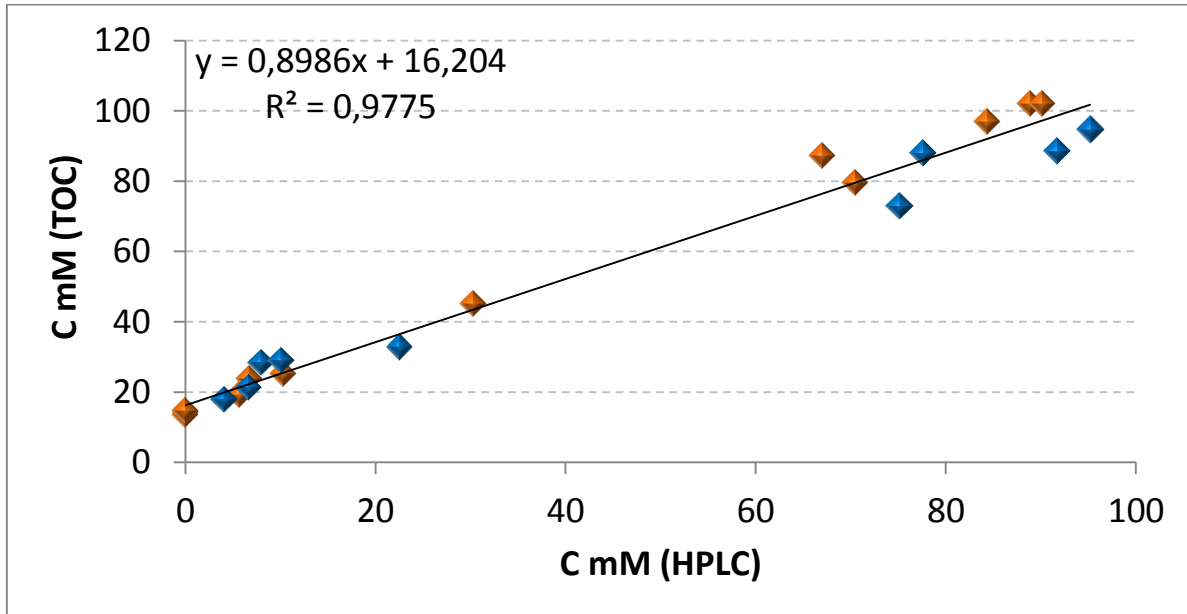
		WT		<i>csrA51</i>		Flux evolution in <i>csrA51</i>
		Lower bound (mg/h/mg _{DW})	Upper bound (mg/h/mg _{DW})	Lower bound (mg/h/mg _{DW})	Upper bound (mg/h/mg _{DW})	
GSP	GlgC	0,02	0,02	0,11	0,11	↑
	Pgm	0,02	0,02	0,11	0,11	↑
Glycolyse	Pgi	6,32	6,32	4,06	4,06	↓
	PfkA	3,82	6,85	2,4	4,09	↓
	Tpi	6,78	6,78	4,04	4,04	↓
	Eno	12,9	12,9	7,54	7,54	↓
	Pyk	0	3,03	0	1,69	×
	Pps	0	0	0	0	-
	Fbp	0	0	0	0	-
PPP	Zwf	1,5	1,5	0,46	0,46	↓
TCA cycle	Icd	5,47	5,47	4,17	4,17	↓
	SucA	4,89	4,89	3,83	3,83	↓
	Mdh	5,45	5,45	4,16	4,16	↓
Gluconeogenesis	AceA	0	0	0	0	-
	AceB	0	0	0	0	-
	Pck	0	0	0	0	-
	Acs	0	0	0	0	-
APP	Pta	1,84	1,84	0	1,68E-05	×
	Ack	1,84	1,84	0	1,68E-05	×

Table 3 : qPCR primers

Name	Sequence (5' to 3')	Name	Sequence (5' to 3')
Q-aceA-3'	AACCAGCAGGGTTGGAACG	Q-aceA-5'	ACATGGGCGGCAAAGTTTAA
Q-aceB-3'	TCAGGCCATAAATCGGCACA	Q-aceB-5'	GGTGAACGCACCGAAGAAGG
Q-ack-3'	TCTTCCACCTGCACGACACC	Q-ack-5'	TCGCTGGTCACTTCGGTCAG
Q-acs-3'	GGATCTTCGGCGTTCATCTC	Q-acs-5'	GGGAAAATTGACTGGCAGGA
Q-eno-3'	GGGTGGTTTTCGTCGGTATGG	Q-eno-5'	CCAGGAAACGGGATTTGTCTG
Q-fbp-3'	GTAGAGATAAATACCGCCTTTCAGCA	Q-fbp-5'	ATAAATCCACCAACCGCCCTTA
Q-glgC-3'	AGATCACCGAAGCCGGTCTG	Q-glgC-5'	GTACCCACATCGCGCCAGTA
Q-icd-3'	TTCGTCACCGATGTTTGAC	Q-icd-5'	CGCCTGTATGAACCTGAACG
Q-idnT-3'	AACACCGTGCCTCTTCTT	Q-idnT-5'	TTACGTCGGCCAGTGTGAA
Q-ihfB-3'	CAAAGAGAAACTGCCGAAACC	Q-ihfB-5'	GCCAAGACGGTTGAAGATGC
Q-mdh-3'	TGGCCCATAGACAGGGTTGC	Q-mdh-5'	CCGAGCAGGAAGTGGCTGAT
Q-pck-3'	GTGTCTACGCCGGCAGTTC	Q-pck-5'	GACGCCATCCTCAACGGTTC
Q-pfkA-3'	CACCCATGTAGGAACCGTCA	Q-pfkA-5'	AATTCCGCGACGAGAACATC
Q-pgi-3'	AGATCCGGCAACGCTTGACT	Q-pgi-5'	CCCAGGCTGAACGGAGTGAT
Q-pgm-3'	ATAACCGCCGGAAGATGGT	Q-pgm-5'	AGTGCGTTGGCCCTGTCTTC
Q-pps-3'	CTGGCTCGTAACGCTCACCA	Q-pps-5'	GTGCCGCTTTTATCCGAAG
Q-pta-3'	ACCGTGTTCAGCGTCTCAG	Q-pta-5'	GCAGTTCGACCAGACGACCA
Q-ptsG-3'	GGAATGTCGCCGTGAAAAAC	Q-ptsG-5'	CCGTTTGGTCTGCACCACAT
Q-pykF-3'	GCAACCATGATGCCGTCAGA	Q-pykF-5'	CGGCGAAAACATCCACATCA
Q-sdhD-3'	ACACACCCACACCACAACG	Q-sdhD-5'	CGTTAAACCGCTGGCTTTGC
Q-sgrS-3'	TCACACATGATGCAGGCAAGTCA	Q-sgrR-5'	GGTTGCGTTGGTTAAGCGTCCC
Q-sucA-3'	GGTGTGAGGGTCGGAGATCG	Q-sucA-5'	ACGGGAGTCAAACCGGATCA
Q-tpi-3'	CATCGGCGCACAGTACATCA	Q-tpi-5'	GCTCTTTCAGCACCGCGAAT
Q-zwf-3'	GCCCTTCGATCCCCACTTCT	Q-zwf-5'	GGCGCTGCGTTTTGCTAACT

Supplementary data 1: Demonstration of the absence of other fermentation products than acetate.

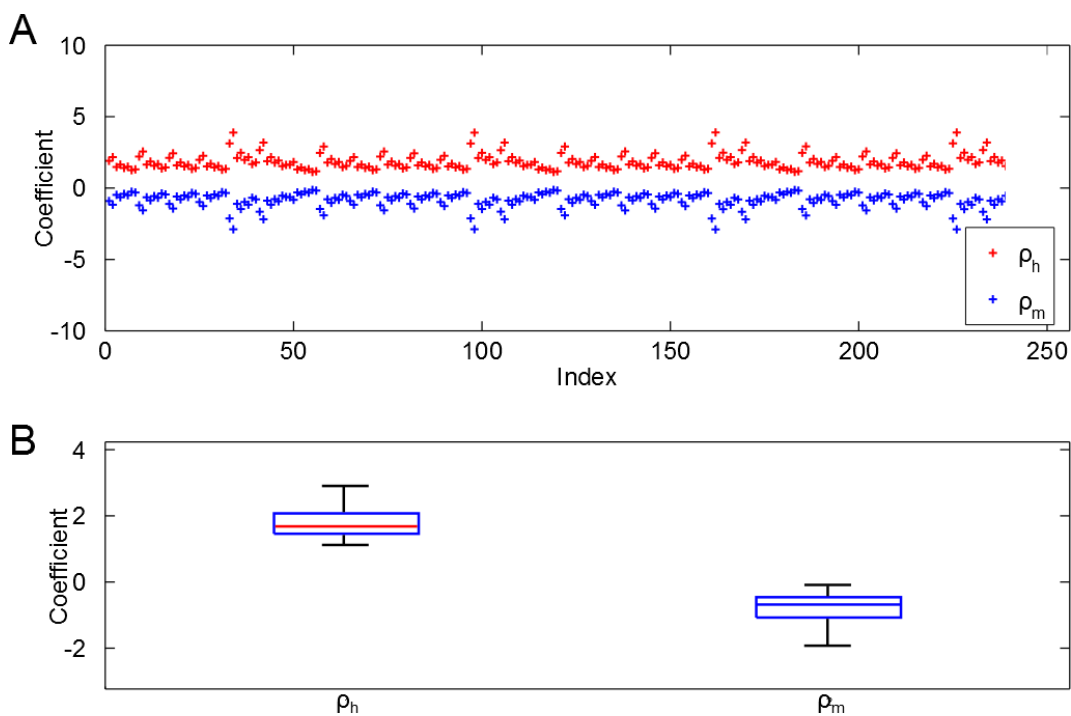
Correlation between cumulated equivalent carbon (C) measured in HPLC (glucose and acetate) and in TOC assays (all carbonated molecules) from supernatants acquired throughout the growth of the two strains. Orange squares: wild-type, Blue: *csrA51*.



The equivalent carbon contents were closely correlated between the HPLC and the TOC analysis. Therefore acetate is the only fermentation product formed in both cultures. The 16.2 mM of carbon revealed by the TOC as a constant during the culture correspond to the antifoam and thiamine products added in the medium before growth started.

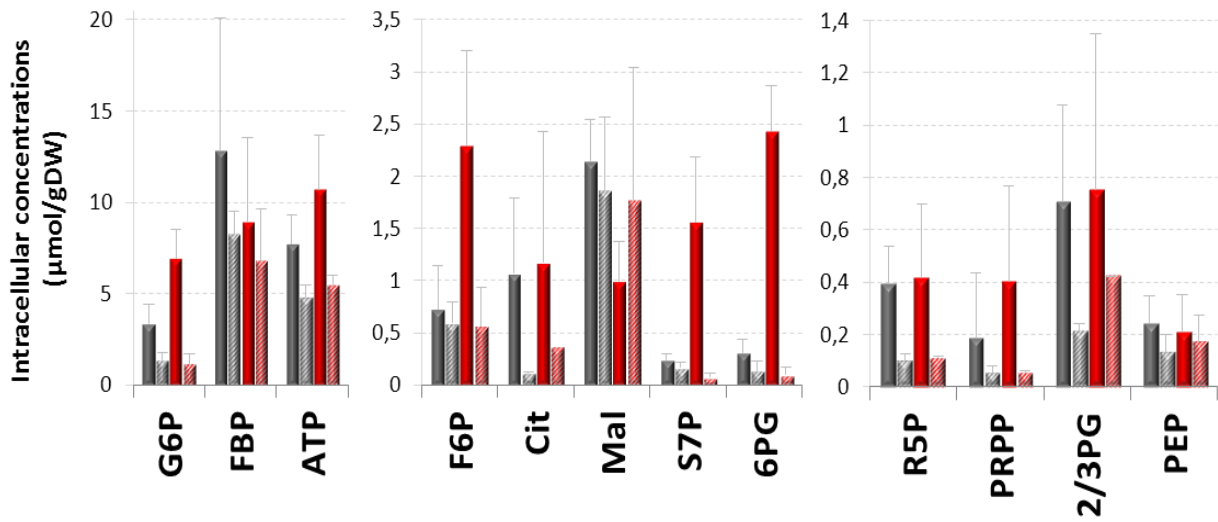
Supplementary data 3: Regulation of metabolic fluxes in the wild-type and *csrA51* strains: case of the reaction catalyzed by Pgm.

(A) Determination of the hierarchical (ρ_h) and metabolic (ρ_m) regulatory coefficients for each replicate of Pgm specific activity and each bound of flux intervals in the wild-type and *csrA51* strains (see Experimental Procedure section in main text for details). (B) Boxplot graphs of the hierarchical and metabolic regulatory coefficients calculated for Pgm with an interquartile range of 1.5. Outliers are not shown on the graph. The values of the coefficients indicate an antagonist regulation of the flux through Pgm: an increase in specific activity due to higher expression of the gene *pgm* is compensated for by a decrease in the concentration of the reaction substrates, products, or effectors.



Supplementary data 4: Intracellular metabolites concentrations in the strains over-expressing *pfkA*.

Plain grey: WT, Striped grey: *WT pfkA+*, Plain red: *csrA51*, Striped red: *csrA51 pfkA+*



CHAPITRE 2

Le système CSR régule indirectement la transition métabolique glucose-acétate en régulant l'accumulation du glycogène durant la phase de croissance sur glucose

La capacité des bactéries à passer d'un substrat carboné à un autre est indispensable à leur survie et leur persistance dans leur environnement. Ces changements de substrats impliquent une réorganisation du métabolisme carboné central (MCC). Ainsi, dans un environnement tel que le colon, *E. coli* alterne entre un métabolisme glycolytique et un métabolisme gluconéogénique (Chang *et al.*, 2004 ; Miranda *et al.*, 2004). Cette transition métabolique est régulée aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. L'implication du régulateur post-transcriptionnel CSR dans la régulation du métabolisme glycolytique a été démontrée dans le chapitre précédent. D'autres études ont également démontré son implication dans la régulation de la gluconéogénèse (Roméo *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 2000). Son implication dans la régulation de la transition d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme gluconéogénique a été supposée par Pernestig *et al.*, en 2003 mais aucune recherche plus avancée n'a été menée à ce sujet. L'étude approfondie du rôle du système CSR au cours de cette transition apporterait des informations supplémentaires quant à la régulation dynamique de cette adaptation métabolique dont le mécanisme n'est pas complètement défini à ce jour.

La souche sauvage K12 MG1655 et trois souches mutées pour le système CSR (*csrA51*, Δ *csrBC* et Δ *csrD*) ont été étudiées durant la transition modèle glucose-acétate. L'acquisition en dynamique de différentes données a permis de suivre tout au long de la transition l'évolution des paramètres de croissance et de différentes composantes moléculaires comme la quantité de glycogène intracellulaire, de transcrits, d'enzymes actives et de métabolites.

Les cultures en bioréacteurs, l'analyse des métabolites extracellulaires et la détermination du contenu intracellulaire en glycogène ont mis en évidence un effet des modifications du système CSR sur la dynamique de la transition glucose-acétate et notamment sur la mise en place de la re-consommation de l'acétate. En effet, plus l'activité de la protéine CsrA est réduite, plus vite les cellules se mettent à re-consommer l'acétate accumulé durant la phase de croissance sur glucose. Ainsi, les souches *csrA51* et Δ *csrD* présentent un délai plus court dans la mise en place de la re-consommation d'acétate que la WT et la souche Δ *csrBC* qui est la souche dont le délai est le plus important. D'autre part, plus l'activité de CsrA est atténuée, plus les cellules accumulent du glycogène durant la phase de croissance sur glucose,

comme attendu au regard de la régulation de la synthèse du glycogène par le système CSR (Romeo *et al.*, 1995). Autrement dit, le glycogène représente jusqu'à 30% de la masse sèche de la souche *csrA51* alors que le mutant $\Delta csrBC$ n'accumule que peu voire pas de glycogène et les souches WT et $\Delta csrD$ présentent des phénotypes intermédiaires. Qu'elle que soit la souche, le glycogène n'est consommé qu'une fois le glucose disparu.

L'analyse en dynamique de l'expression des gènes du MCC a montré que les différences observées concernant la mise en place de la re-consommation d'acétate ne sont pas associées à une modification de l'expression de ces gènes. A part pour la souche *csrA51*, qui durant la phase de consommation de glucose présente une expression modifiée pour les gènes du MCC (chapitre 1), aucune différence des profils d'expression entre les différentes souches n'a été observée. L'observation des métabolites intracellulaires a mis en évidence une disparité au niveau des profils des métabolites énergétiques entre les souches. Celle-ci se traduit par une différence du statut énergétique des souches après la disparition du glucose. En effet, alors que chaque souche présente une charge énergétique associée à une phase de croissance exponentielle ($AEC > 0.8$) durant la phase de consommation du glucose, la souche *csrA51* maintient un niveau énergétique élevé après la disparition du glucose alors que la souche $\Delta csrBC$ montre une forte chute de sa charge énergétique ($AEC = 0.4$). La charge énergétique des souches WT et $\Delta csrD$ diminue également après la disparition du glucose mais de façon moins spectaculaire pour atteindre une valeur associée à une phase stationnaire ($AEC \in [0.5 ; 0.8]$).

Toutes ces données indiquent que plus l'activité de CsrA est diminuée, plus les cellules accumulent de glycogène, plus vite elles mettent en place la consommation d'acétate et plus leur charge énergétique au moment de la re-consommation d'acétate est importante. Afin de comprendre les relations de causes à effets entre ces observations nous avons construit des mutants incapables de synthétiser du glycogène dans les backgrounds génétiques des souches WT et *csrA51*. Une analyse similaire des métabolites intra-cellulaire et de la charge énergétique a mis en évidence la dépendance de la charge énergétique après disparition du glucose à la quantité de glycogène accumulé durant la phase sur glucose. Les mutants incapables de synthétiser du glycogène, présentent une AEC similaire à celle de la souche

$\Delta csrBC$ une fois le glucose consommé. Finalement, la détermination pour chacune des six souches (WT, *csrA51*, $\Delta csrD$, $\Delta csrBC$, $\Delta glgC$ et *csrA51* $\Delta glgC$) du temps de latence associé à la reprise de croissance sur un milieu riche en acétate quand les cellules sont transférées depuis un milieu riche en glucose ou pauvre en acétate a montré que le glycogène est également à l'origine de la dynamique de mise en place du métabolisme de re-consommation de l'acétate une fois le glucose disparu.

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en évidence l'implication du système CSR dans la régulation du MCC lors de la transition glucose-acétate. Même si celle-ci est dorénavant démontrée, elle est indirecte et repose principalement sur la régulation de l'accumulation de glycogène durant la première de phase de culture. D'autre part, cette étude a montré l'importance du glycogène comme sucre de réserve dans la capacité d'adaptation des cellules, ce qui n'avait jusqu'alors été qu'une supposition.

Ces travaux ont été rédigés sous la forme d'un article et seront très prochainement soumis dans une revue à comité de lecture.

The CSR system controls *Escherichia coli* energetic levels after the glucose-acetate transition through glycogen accumulation

Manon MORIN^{1,2,3,4} *et al.*

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, LISBP, F-31400 Toulouse, France.

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France.

⁴ Inria Grenoble-Rhône-Alpes. 655 avenue de l'Europe, 38334 Montbonnot Cedex. France

Keywords: Carbon metabolism/ Glycogen/ CSR system/ *Escherichia coli*.

Running title: The CSR system controls *Escherichia coli* energetic charge through its glycogen accumulation.

ABSTRACT

In the bacterium *Escherichia coli*, the post-transcriptional regulator CSR was described to possibly influence the transition from glycolysis to gluconeogenesis. Here, we explored the role of CSR in the glucose-acetate transition as a model of glycolysis to gluconeogenesis switch. Mutations in the CSR system affected the timing of acetate re-consumption after glucose exhaustion, but poorly impacted the timing of the reorganization of gene expression during the transition. Analysis of metabolite concentrations during the transition revealed that the CSR system has a major influence on the energetic levels of the cells after glucose exhaustion. This influence was demonstrated to directly result from the impact of CSR on glycogen accumulation during glucose consumption. Glycogen deficiency was also demonstrated to hinder metabolic adaptation after glucose exhaustion. This work explains how the CSR system impacts the glycolysis-gluconeogenesis switch and demonstrates the role of glycogen to maintain the energetic charge during metabolic adaptation.

INTRODUCTION

Metabolic adaptation is the capacity to switch from one substrate to another. This mechanism is fundamental for fitness and survival of microorganisms (Miranda *et al.*, 2004; Pernestig *et al.*, 2003). For the model bacterium *Escherichia coli*, metabolic adaptation influences the productivity of bioprocesses and impacts the persistence in the gut. *E. coli* consumes first sugars and sugar derivatives through glycolytic pathways and in absence of such substrates, it uses less favorable molecules such as acetate, succinate or formate (Chang *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2004). Consumption of the latter requires the activation of the gluconeogenic pathway. Since the availability of carbon substrates in the gut is ever-changing, metabolic adaptation and in particular, the capacity to switch from glycolytic to gluconeogenic metabolisms is a key to *E. coli* colonization and persistence (Fabich *et al.*, 2008).

If the metabolic organization of *E. coli* is well-understood, the understanding of metabolic adaptation is still incomplete (Enjalbert *et al.*, 2013; Hines *et al.*, 2007; Kotte *et al.*, 2010; Wolfe, 2005). In the central carbon metabolism (CCM), the accumulation of several layers of regulatory mechanisms (transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational regulations) ends up in a complex and entangled control of carbon fluxes. At the post-transcriptional level (*i.e.* control of messengers RNA stability and translation initiation), the major controller reported so far in the CCM is the carbon storage regulator system CSR (Edwards *et al.*, 2011; McKee *et al.*, 2012; Romeo *et al.*, 1993a; Sabnis *et al.*, 1995; Morin *et al.*, in preparation (chapter 1)). This post-transcriptional controller is highly pleiotropic and involved in the regulation of most adaptive phenomena such as virulence (Bhatt *et al.*, 2009), mobility (Wei *et al.*, 2001; Yakhnin *et al.*, 2013), stringent response (Edwards *et al.*, 2011) and glycogen synthesis (Romeo *et al.*, 1993a; Yang *et al.*, 1996). Its main component is the essential protein CsrA, which is able to bind to target mRNAs leading to their degradation or their stabilization. CsrA activity is controlled through sequestration by CsrB and CsrC, two non-coding RNAs (Gudapaty *et al.*, 2001; Liu and Romeo, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003). Both of these ncRNAs are targeted by the protein CsrD that triggers their degradosome-dependent degradation (Suzuki *et al.*, 2006). Transcription of CsrB and CsrC is indirectly activated by the two component system BarA/UvrY (Gudapaty *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Weilbacher *et*

al., 2003). CSR is described to positively regulate glycolysis while inhibiting gluconeogenesis (Romeo *et al.*, 1993a; Sabnis *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000). It is supposed to be involved in the switch between both metabolisms since the BarA/UvrY two component system is needed for an efficient transition from a glycolytic metabolism to a gluconeogenic one (Pernestig *et al.*, 2003).

Here, we investigated the putative role of the CSR system in the metabolic adaptation from glycolysis to gluconeogenesis. Gene expression and metabolite pool analysis were performed all along the glucose-acetate transition as a model of metabolic adaptation (Enjalbert *et al.*, 2013, 2015; Kotte *et al.*, 2010). This highlighted the essential role of the CSR system to maintain the energetic charge in the cell during metabolic transition through its control of glycogen accumulation.

RESULTS

The CSR system impacts the dynamic of acetate re-consumption after glucose exhaustion

To assess the influence of the CSR system in the metabolic adaptation from glycolytic to gluconeogenic metabolism, the glucose-acetate transition was used as a model (Enjalbert *et al.*, 2013, 2015; Kotte *et al.*, 2010). Behaviors of three strains with modified CSR activities were investigated (*csrA51*, Δ *csrBC* and Δ *csrD* strains). Deletion of both *csrB* and *csrC* in the Δ *csrBC* strain is known to increase CsrA activity by preventing its sequestration by these two ncRNAs (Liu and Romeo, 1997; Weilbacher *et al.*, 2003). Deletion of *csrD* triggers an increase of CsrB and CsrC ncRNA levels which promotes the sequestration of CsrA and reduces its activity (Suzuki *et al.*, 2006). In the *csrA51* strain, the deletion of the CsrA last 11 amino-acids were reported to reduce its activity (Morin *et al.*, in preparation (chapter 1); Romeo *et al.*, 1993). The three mutants and their wild-type isogenic control have been grown in bioreactors in 500mL of M9 minimum medium supplemented with 2.7 % of Glucose (Enjalbert *et al.*, 2013). The biomass, the glycogen content and the extracellular glucose and acetate evolutions have been followed every 30 minutes (Figure 1). As expected from previous work (Morin *et al.*, in preparation (chapter 1)), the *csrA51* growth rate was lower on glucose (Figure 1A). No significant differences were observed between the wild-type and the Δ *csrBC* and Δ *csrD* strains

during the growth on glucose. This is corroborated by the similar glucose consumption profiles of these strains (Figure 1B). No significant differences in the biomass profiles were observed during and after the transition from glucose to acetate for the four strains (Figure 1A). The *csrA51* strain accumulated very little amount of extracellular acetate during the growth on glucose in regard to the three other strains whose production rates and final levels of acetate were similar (Figure 1C). This small amount of acetate in the *csrA51* strain is consumed in the minutes preceding glucose exhaustion. Acetate is eventually consumed by the three other strains at similar rates, but the setting of this acetate utilization is faster for the $\Delta csrD$ strain over the wild-type, while the $\Delta csrBC$ acetate consumption is delayed (Figure 1C).

Since the *csrA51* strain is reported to over-accumulate glycogen (Liu *et al.*, 1995; Morin *et al.*, in preparation (chapter 1); Romeo *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1996), we assessed the content in the cells of this storage sugar during the glucose-acetate transition (Figure 1D). The *csrA51* strain accumulated glycogen up to about 30 % of the biomass dry weight. In deep contrast, little if any glycogen was stored by the $\Delta csrBC$ cells. Glycogen represented 7 % of the $\Delta csrD$ cells dry weight and 4 % of the WT. Glycogen content in the four strains was found stable during the exponential phase of growth on glucose. After glucose exhaustion, the glycogen was consumed by the four strains.

The investigated strains presented an interesting range of phenotypes in regard to the way they affect CsrA activity. The *csrA51* mutant was the most affected strain with a high content of glycogen, a low level of acetate and a reduced growth rate. The $\Delta csrD$ presented also a higher glycogen content than the wild-type and an accelerated acetate consumption setting. In contrast, the $\Delta csrBC$ displayed the reverse phenotypes (low to null glycogen content and delayed acetate consumption setting). We therefore conclude that the CSR system is involved in the dynamic of the glycolysis-gluconeogenesis transition, notably, through its impact on the setting of acetate consumption after glucose exhaustion.

Dynamic of genes expression during the glucose-acetate transition is weakly impacted by CSR

To find the molecular origins of the delay to consume acetate between the strains, the expression of 12 key CCM genes has been assessed by qRT-PCR during the metabolic transition (from about 3 hours before to 2 hours after glucose exhaustion; Figure 2). During the growth on glucose, the gene expression levels of almost all the studied genes were significantly different for the *csrA51* strain compared to the WT strain as previously described in Morin *et al.* (chapter 1). However, hardly any significant differences were observed between the WT, $\Delta csrBC$ and $\Delta csrD$ strains on glucose. For the four strains, the dynamic and direction of mRNA pools variations at glucose exhaustion were generally similar. Glycolytic genes, TCA cycle genes and *zwf* were repressed; whereas genes associated to acetate metabolism (*pck* and *acs*) were induced. Finally only mRNAs from *acs* and *glgC* displayed different concentrations 90 minutes after glucose exhaustion.

In conclusion, genes expression profiles were very similar during the transition and no particular differences can explain the differences in acetate re-consumption dynamic.

Metabolite pools analysis reveals different energetic status in the CSR mutant strains after glucose exhaustion

We then measured key metabolite pools of the CCM and energetic metabolites by LC/MS/MS all along the cultures in the four strains (Figure 3).

The evolution profiles of the assessed metabolites in the CCM (Figure 3A) were mostly similar in the four strains. These profiles were characterized by a drop in all concentrations after glucose exhaustion, but for the alarmone cAMP. Few differences in CCM metabolite concentrations were observed between the WT, $\Delta csrD$ and $\Delta csrBC$ strains. The $\Delta csrBC$ displayed higher concentrations for the FBP, PEP and malate during the glucose consumption phase whereas the $\Delta csrD$ pools were mostly comparable to the WT. In contrast, the *csrA51* strain displayed different profiles for pools in the upper glycolysis (G6P, F6P). As expected, these pools were higher during glucose consumption (Morin *et al.*, in preparation (chapter 1)), decreased after glucose exhaustion but unexpectedly, they were maintained at levels

equivalent to those observed during the glucose-based growth of the wild-type strain (Figure 3A).

Whereas few metabolite variations were observed in CCM metabolites, many differences in energetic metabolite pools were found (Figure 3B). The nucleotide triphosphate pools (ATP, UTP and CTP) remained at high levels in the *csrA51* strain even after glucose exhaustion, while the lowest pools were observed for the $\Delta csrBC$ strain. Since such discrepancies were likely to have an impact on the energetic state of the cells we calculated the adenylate energetic charge (AEC ; Chapman *et al.*, 1971) to investigate the cell energetic status in the four strains (Figure 3B). The AEC on glucose was between 0.83 and 0.90 for all the strains during the glucose consumption phase (Figure 3B). Such values are expected in exponentially growing cells (Chapman *et al.*, 1971). 100 minutes after glucose exhaustion, the AEC has decreased for all the strains. However, the AEC of the *csrA51* strain remained as high as 0.79, while it decreased to 0.71 in the wild-type and $\Delta csrD$ strains, and collapsed to 0.44 in the $\Delta csrBC$ strain. An AEC of 0.44 is related to dying cells (Chapman *et al.*, 1971).

In conclusion, no difference in CCM metabolites was found to explain the delay in acetate re-consumption. However energetic metabolite analysis highlighted discrepancies in the energetic status of the strains after glucose exhaustion: the *csrA51* strain maintained a high energetic level whereas the $\Delta csrBC$ presented a dramatic drop in its energetic status. Since the *csrA51* strain showed the quickest adaptation and the $\Delta csrBC$ strain showed the slowest, this capacity could be directly correlated to the energetic status of the cells immediately after glucose exhaustion.

Suppressing glycogen synthesis hinders the capacity of the csrA51 strain to maintain high energetic levels after glucose exhaustion.

To maintain their high energetic status after glucose exhaustion, the *csrA51* cells require an energetic substrate. Since this strain does not accumulate fermentation product in the extracellular medium (Morin *et al.*, in preparation (chapter 1)), such substrate has to be intracellular. We therefore hypothesized that the high glycogen content observed in Figure 1D for the *csrA51* strain could be the substrate allowing the maintenance of the energetic status

after glucose exhaustion. To demonstrate this hypothesis, glycogen synthesis was prevented in the wild-type and *csrA51* strains by deleting the *glgC* gene. The same metabolites pools as in Figure 3 were then assessed during the glucose-acetate transition of the wild-type, $\Delta glgC$, *csrA51* and *csrA51* $\Delta glgC$ strains (Figure 4A). Some of the wild-type and *csrA51* metabolite pools such as FBP are quantitatively different from Figure 3, very likely due to the fact that these cultures were performed in Erlen-Meyer flask instead of pH- and O₂- regulated reactors. However, the trends are similar in both conditions. Remarkably, the deletion of *glgC* totally prevented the maintenance of elevated G6P, F6P and nucleotides triphosphate in the *csrA51* strain. Before glucose exhaustion, preventing glycogen synthesis did not affect the AEC (Figure 4B). After glucose exhaustion, the AEC of the two strains unable to store glycogen dropped drastically in regard to the wild-type and the *csrA51* strains. We therefore conclude that the maintenance of the energetic status after glucose exhaustion observed in the *csrA51* strain results from its high glycogen content.

The CSR system impacts metabolic adaptation through its control of glycogen synthesis.

Taken together, the above results suggest that CSR impacts the metabolic adaptation after glucose exhaustion by influencing the energetic status through the control of glycogen synthesis. To demonstrate this scenario, we investigated the capacity of CSR and/or glycogen mutant cells sampled before or after glucose exhaustion to resume growth on a fresh acetate-based medium (Figure 5). Accordingly to Enjalbert *et al.*, (2015), the wild-type strain required 38 minutes to switch from glucose-based to acetate-based growth. This delay is reduced to 21 minutes when the cells are sampled one hour after glucose exhaustion, likely due to the induced expression of gluconeogenic enzymes (Enjalbert *et al.*, 2015). These delays were similar in the $\Delta csrD$ strain. In the *csrA51* strain, the delays were increased by 40 to 50 % but the same relative decrease was observed after glucose exhaustion. The delay of the $\Delta csrBC$ strain growing on glucose was similar to the wild-type one. In contrast, the $\Delta csrBC$ strain delay is not reduced after glucose exhaustion. This property was also observed for the $\Delta glgC$ and the *csrA51* $\Delta glgC$ strains (Figure 5). The increase in the delays of the *csrA51* strain switches on acetate was also suppressed in the *csrA51* $\Delta glgC$ strain. Since the $\Delta csrBC$ strain glycogen levels

are null after glucose exhaustion (Figure 1D), we conclude that glycogen is necessary to the setup of acetate utilization one hour after glucose exhaustion.

Therefore, the CSR system impacts the setting of metabolic adaptation after glucose exhaustion through its control of glycogen synthesis.

DISCUSSION

In this work, we established that post-transcriptional regulations mediated by CSR are involved in *E. coli* metabolic adaptation from glycolysis to gluconeogenesis. Acetate profile and switch experiments demonstrated that CSR influences the timing to mount acetate utilization after glucose exhaustion. This control results from the impact of CSR on the glycogen accumulation during the exponential growth on glucose. After glucose exhaustion, we proved that glycogen allows the maintenance of the cellular energetic level. In the *csrA51* strain, the over-accumulation of glycogen is even accompanied by high levels of G6P, F6P and energetic status matching those of the wild-type during the growth on glucose. Conversely, a $\Delta csrBC$ strain which accumulates very low level of glycogen presented phenotypes similar to a $\Delta glgC$ strain, with low energetic status after glucose exhaustion and weaker adaptive capability to use acetate after glucose exhaustion.

The CSR system was recently demonstrated to be a major controller of the upper glycolysis fluxes (Morin *et al.*, in preparation (chapter 1)). The question of CSR involvement in the metabolic adaptation was more elusive in the literature. Pernestig *et al.*, (2003) suggested that the CSR system through the BarA-UvrY two-component system is crucial for efficient adaptation between different metabolic pathways. From our work, it is now obvious that CSR regulates the metabolic transition from glycolysis to gluconeogenesis. Most of the elements presented here strengthen that this control is exerted through the regulation of the glycogen synthesis. Interestingly, the only clue about a glycogen-independent effect of CSR during the transition is in the cAMP production, an alarmone with important function in the catabolite repression (Zheng *et al.*, 2004). Indeed, a *csrA51* strain induced cAMP production after glucose

exhaustion, but the levels were about 5 times lower than in the wild-type. This could result from the higher availability of G6P since this substrate indirectly controls the adenylate cyclase activity (Bettenbrock *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2006). However, the *csrA51 ΔglgC* strain presents the same phenotype, which proves that this lower cAMP level is not resulting from the higher glycogen content and is therefore directly linked to CSR activity. CSR could thus impact important metabolic adaptation process such as the catabolite repression independently of the glycogen content. Another observation could have supported a glycogen-independent control of CSR during the transition: as we assumed here that glycogen exhaustion would hamper adaptation, the *csrA51* strain which accumulates a larger amount of glycogen should display a shorter lag time for acetate adaptation. Surprisingly it was not the case (Figure 5). However, high G6P levels resulting from glycogen degradation in this strain are likely to supply the glycolysis and thus preventing the setup of gluconeogenic metabolism. Since this phenotype is glycogen-dependent after all, we thus conclude that the CSR control in metabolic adaptation is mainly mediated through glycogen accumulation. This explains why we found so little alterations for the gene expression profiles in the CCM, but for the gene related to glycogen synthesis (*pgm* and *glgC*). The regulation of these transcription units is likely to be sufficient to explain the variation in glycogen content of the CSR mutants and all the resulting metabolic and phenotypic consequences after glucose exhaustion. It is also important to emphasize that CSR mutations did not totally suppress metabolic adaptation but appears to retard the phenomenon, which could be damaging in a competitive environment such as the gut. From all these elements and because CSR controls glycogen level during the exponential phase of growth on glucose, we believe that this regulatory system has a strong indirect impact on the glycolysis-gluconeogenesis transition through its control of glycogen accumulation but a limited true direct involvement on CCM genes expression regulation.

Given its structural characteristics and its metabolic regulation, glycogen was hypothesized to be a storage compound providing both carbon and energy for the microorganisms that accumulate them (Preiss *et al.*, 1983). However, the demonstration of this function was still needed in the literature (Eydallin *et al.*, 2010; Wang and Wise, 2011; Yamamotoya *et al.*, 2012). Here, we proved with a metabolomic approach that glycogen is

essential to maintain the cellular energetic level after glucose exhaustion. To our knowledge, this is the first reported direct demonstration of this property. This is especially important since Preiss (Preiss, 1984) postulated that to classify glycogen as an energy-storage compound, its use as a supply for energy of maintenance should be demonstrated. With this work, such a demonstration is now achieved. Glycogen metabolism was also linked to environmental survival (Wang and Wise, 2011). It was recently hypothesized and backed up by modeling that glycogen is an energy supply for immediate usage in the next growth phase of *E. coli* (Yamamotoya *et al.*, 2012). Here again, we experimentally demonstrated the veracity of these *in silico*-based conclusions by showing that metabolic adaptation of cells is dependent on the glycogen content. Thus, this work incidentally provides decisive clues about the function of glycogen in *E. coli*.

To conclude, this work is of special importance to understand (i) the function of CSR-mediated post-transcriptional control, (ii) the role of glycogen in bacteria and (iii) the mechanisms of metabolic adaptation. Such knowledge is fundamental to control the ability of *E. coli* to efficiently colonize the gut, but also to optimize biotechnological processes in which the metabolic flexibility of *E. coli* is extensively exploited to use a broad range of substrates.

MATERIALS AND METHODS

Strains

The strain background is *Escherichia coli* K12 MG1655 (WT). *csrA51* strain has been built through deletion of the 10 last amino acid of the CsrA protein by using λ red system recombination (Esquerre *et al.*, (submitted)). $\Delta csrD$ strain was constructed by complete deletion of the *csrD* gene using λ red system recombination (Esquerre *et al.*, (submitted)). $\Delta csrBC$ strain presents a complete deletion of the two non-coding RNA CsrB and CsrC by using λ red system recombination. $\Delta glgC$ strains have been obtained by moving the mutant allele $\Delta glgC::Kan^R$ of the strain JW3393-1 (Keio collection ; Baba *et al.*, 2006) into both the MG1655 and *csrA51* genetic background by bacteriophage P1-mediated transduction.

Growth conditions

Bioreactor cultures were performed in a volume of 500mL M9 medium complemented with 2.7g/L of *D*-Glucose with pH and oxygenation controls (Morin *et al.* in preparation (chapter 1)). At least two biological replicates per strain have been produced. All along the cultures, OD at 600nm, extra and intra-cellular metabolites have been measured every 30 minutes. Flask cultures were performed in 200 ml Erlen-Meyer baffled flasks in a total volume of 50 mL of M9 medium supplemented with 2.7g/L of glucose. All the cultures were performed at 37°C.

Extracellular and intracellular metabolites

The extracellular metabolites have been determined and quantified by using H+ HPLC (Agilent Technologies 1200 Series HPLC and Aminex HPX-87h column for acid and sugar separation). The analysis was carried out at 48°C using H₂SO₄ 5mM as an eluent. Intracellular metabolites were sampled at 4 different times of the cultures using the differential method described by Taymaz-Nikerel *et al.*, (2009). The metabolic intracellular content was assessed by LC/MS/MS as described in Morin *et al.* (chapter 1). Adenylate energy charge (AEC) was quantified as previously described by Chapman *et al.* (1971).

RT-PCR analysis

Gene expression levels were analyzed using Q-PCR EvaGreen experiment on a Biomark 96.96 dynamic array (Fluidigm, San Fransisco, California, USA), as described in Morin *et al.* (chapter 1). Briefly, the equivalent of 5 mg cell dry weight were harvested and directly flash-frozen in liquid nitrogen at the same culture points than for the intracellular metabolites. RNA extraction and reverse transcription were performed as described in Esquerré *et al.* (2014). The transcripts levels have been normalized to *idnT* used as a stable reference (Zhou *et al.*, 2011).

Intracellular Glycogen quantification

Glycogen quantification was done accordingly to the procedure of Parrou and François (1997). Briefly the cells were lysed and glycogen was hydrolyzed by an amyloglucosidase into glucose subunits. The glucose sub-units were then quantified using a glucose oxidase/peroxidase reagent (Sigma-Aldrich).

Switch experiments

To investigate the timing of phenotypic adaptation, cell samples were collected from a “mother” culture before (-60 to 0 minutes accordingly to the glucose exhaustion time) and after glucose exhaustion (40 to 60 minutes after), as described in Enjalbert *et al.* (2015). Briefly, cells samples were rapidly filtered, rinsed and used to inoculate 200 ml Erlen-Meyer flasks filled with 30 ml of acetate medium. Growth of the “daughter” cultures was monitored at times 0, 15, 80 and 120 minutes after inoculation by spectrophotometry at OD_{600nm}. We made sure that the cells from the daughter culture reached the maximal growth rate (μ_{max}) by measuring the growth rate between 80 and 120 minutes. The lag time calculation was performed as described in Enjalbert *et al.* (2015).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sophie Mondeil, Alessandra Fontana, Aurélien Staes, Andrea Belluati and Frédéric Anglès for their worthy contributions. This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (Department ‘Microbiology of the Food Chain’) and the Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique) from which MM received a doctoral fellowship. MetaToul (Metabolomics & Fluxomics Facilities, Toulouse, France, www.metatoul.fr) and its staff members (Lara Gales and Lindsey Peyriga) are gratefully acknowledged for access to NMR and mass spectrometry facilities. MetaToul is part of the national infrastructure MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010 (The French National infrastructure for metabolomics and fluxomics, www.metabohub.fr). Gene expression data were obtained with the support of the Genomic and Transcriptomic Platform of Auzeville (France).

REFERENCES

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* *2*, 2006.0008.
- Bettenbrock, K., Sauter, T., Jahreis, K., Kremling, A., Lengeler, J.W., and Gilles, E.-D. (2007). Correlation between growth rates, EllACrr phosphorylation, and intracellular cyclic AMP levels in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* *189*, 6891–6900.
- Bhatt, S., Edwards, A.N., Nguyen, H.T.T., Merlin, D., Romeo, T., and Kalman, D. (2009). The RNA Binding Protein CsrA Is a Pleiotropic Regulator of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* *77*, 3552–3568.
- Chang, D.-E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., *et al.* (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7427–7432.
- Chapman, A.G., Fall, L., and Atkinson, D.E. (1971). Adenylate Energy Charge in *Escherichia coli* During Growth and Starvation. *J. Bacteriol.* *108*, 1072–1086.
- Edwards, A.N., Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Mercante, J.W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M.I., Fields, J.A., Thompson, S.A., Georgellis, D., *et al.* (2011). Circuitry Linking the Csr and Stringent Response Global Regulatory Systems. *Mol. Microbiol.* *80*, 1561–1580.
- Enjalbert, B., Letisse, F., and Portais, J.-C. (2013). Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*. *Metabolites* *3*, 820–837.
- Enjalbert B, Coccagn-Bousquet M, Portais J-C, Letisse F. 2015. Acetate exposure determines the diauxic behavior of *Escherichia coli* during the glucoseacetate transition. *J Bacteriol* *197*,3173–3181.
- Esquerré, T., Laguerre, S., Turlan, C., Carpousis, A.J., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2014). Dual role of transcription and transcript stability in the regulation of gene expression in *Escherichia coli* cells cultured on glucose at different growth rates. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2460–2472.
- Esquerré, T., Turlan, C., Bouvier, M., Carpousis, A.J., Coccagn-Bousquet, M., and Girbal, L. (2014). Genome-wide extent of the CSR system on mRNA expression and stability in *Escherichia coli*. **Submitted.**
- Eydallin, G., Montero, M., Almagro, G., Sesma, M.T., Viale, A.M., Muñoz, F.J., Rahimpour, M., Baroja-Fernández, E., and Pozueta-Romero, J. (2010). Genome-wide screening of genes whose enhanced expression affects glycogen accumulation in *Escherichia coli*. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* *17*, 61–71.

- Fabich, A.J., Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., McHargue, J.W., Hightower, G.A., Smith, J.T., Autieri, S.M., *et al.* (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect. Immun.* **76**, 1143–1152.
- Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Regulatory Interactions of Csr Components: the RNA Binding Protein CsrA Activates *csrB* Transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 6017–6027.
- Hines, J.K., Kruesel, C.E., Fromm, H.J., and Honzatko, R.B. (2007). Structure of Inhibited Fructose-1,6-bisphosphatase from *Escherichia coli*: distinct allosteric inhibition sites for amp and glucose 6-phosphate and the characterization of a gluconeogenic switch. *J. Biol. Chem.* **282**, 24697–24706.
- Kotte, O., Zaugg, J.B., and Heinemann, M. (2010). Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 355.
- Liu, M.Y., and Romeo, T. (1997). The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **179**, 4639–4642.
- Liu, M.Y., Yang, H., and Romeo, T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* **177**, 2663–2672.
- McKee, A.E., Rutherford, B.J., Chivian, D.C., Baidoo, E.K., Juminaga, D., Kuo, D., Benke, P.I., Dietrich, J.A., Ma, S.M., Arkin, A.P., *et al.* (2012). Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* **11**, 79.
- Miranda, R.L., Conway, T., Leatham, M.P., Chang, D.E., Norris, W.E., Allen, J.H., Stevenson, S.J., Laux, D.C., and Cohen, P.S. (2004). Glycolytic and gluconeogenic growth of *Escherichia coli* O157:H7 (EDL933) and *E. coli* K-12 (MG1655) in the mouse intestine. *Infect. Immun.* **72**, 1666–1676.
- Morin, M., Ropers, D., Létisse, F., Laguerre, S., Portais, J.C., Cocaïn-Bousquet, M., and Enjalbert, B. The post-transcriptional regulatory system CSR controls the balance of metabolic pools in upper glycolysis of *Escherichia coli*. **In preparation.**
- Park, Y.-H., Lee, B.R., Seok, Y.-J., and Peterkofsky, A. (2006). In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 6448–6454.
- Parrou, J.L., and François, J. (1997). A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* **248**, 186–188.
- Pernestig, A.-K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., and Melefors, Ö. (2003). The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System Is Needed for Efficient Switching between Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Sources. *J. Bacteriol.* **185**, 843–853.

Preiss, J. (1984). Bacterial Glycogen Synthesis and its Regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 419–458.

Preiss, J., Yung, S.-G., and Baecker, P.A. (1983). Regulation of bacterial glycogen synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* **57**, 61–80.

Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* **175**, 4744–4755.

Sabnis, N.A., Yang, H., and Romeo, T. (1995). Pleiotropic Regulation of Central Carbohydrate Metabolism in *Escherichia coli* via the Gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29096–29104.

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2002). Regulatory Circuitry of the *CsrA/CsrB* and *BarA/UvrY* Systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 5130–5140.

Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R., and Romeo, T. (2006). Identification of a novel regulatory protein (*CsrD*) that targets the global regulatory RNAs *CsrB* and *CsrC* for degradation by RNase E. *Genes Dev.* **20**, 2605–2617.

Taymaz-Nikerel, H., de Mey, M., Ras, C., Pierick, A. ten, Seifar, R.M., van Dam, J.C., Heijnen, J.J., and van Gulik, W.M. (2009). Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **386**, 9–19.

Wang, L., and Wise, M.J. (2011). Glycogen with short average chain length enhances bacterial durability. *Naturwissenschaften* **98**, 719–729.

Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, A.J., and Romeo, T. (2000). Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. *J. Bacteriol.* **182**, 1632–1640.

Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.-M., Simecka, J.W., Prüß, B.M., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein *CsrA* of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **40**, 245–256.

Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **48**, 657–670.

Wolfe, A.J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 12–50.

Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2013). *CsrA* activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol. Microbiol.* **87**, 851–866.

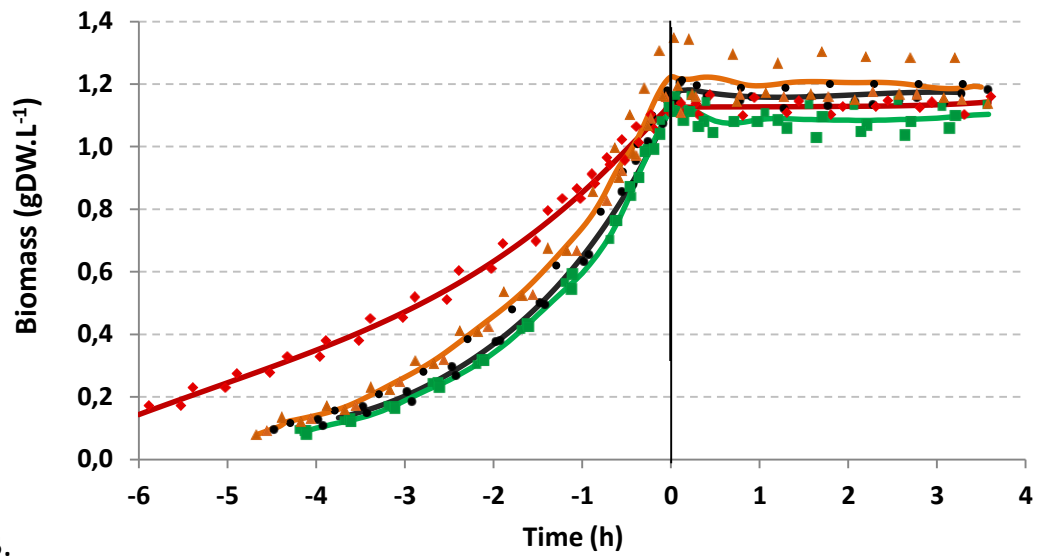
Yamamotoya, T., Dose, H., Tian, Z., Fauré, A., Toya, Y., Honma, M., Igarashi, K., Nakahigashi, K., Soga, T., Mori, H., *et al.* (2012). Glycogen is the primary source of glucose during the lag phase of *E. coli* proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* *1824*, 1442–1448.

Yang, H., Liu, M.Y., and Romeo, T. (1996). Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J. Bacteriol.* *178*, 1012–1017.

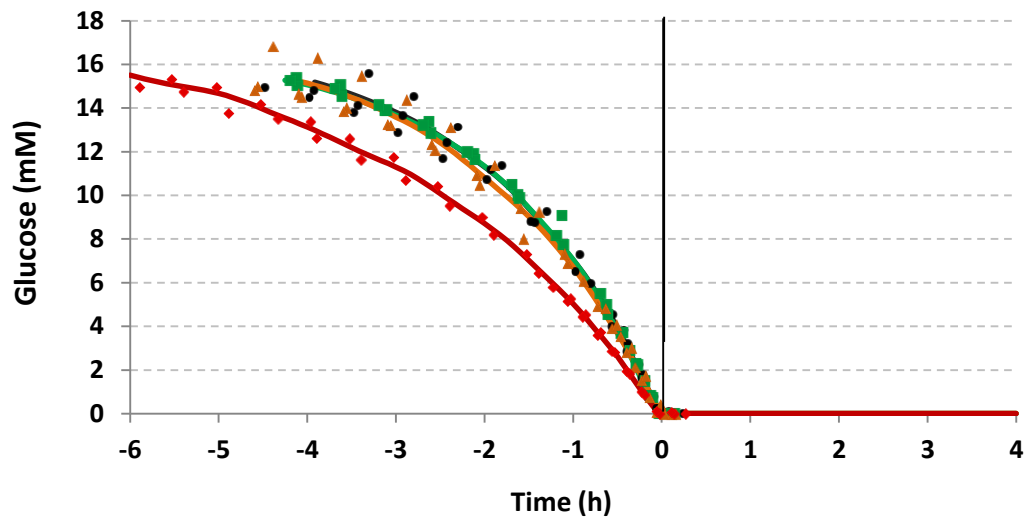
Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J.L., and Minchin, S.D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* *32*, 5874–5893.

Zhou, K., Zhou, L., Lim, Q., 'En, Zou, R., Stephanopoulos, G., and Too, H.-P. (2011). Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of *Escherichia coli* to protein overexpression by quantitative PCR. *BMC Mol. Biol.* *12*, 18.

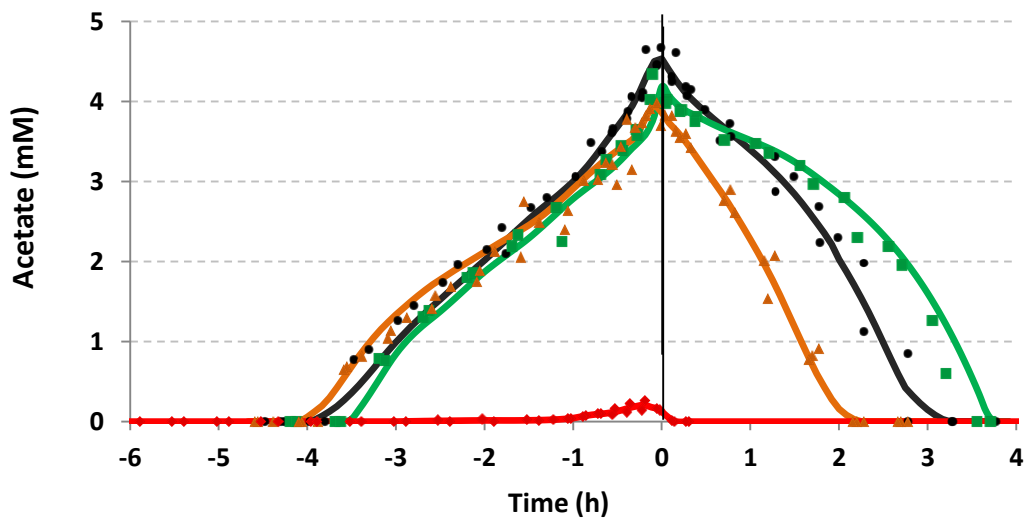
A.



B.



C.



D.

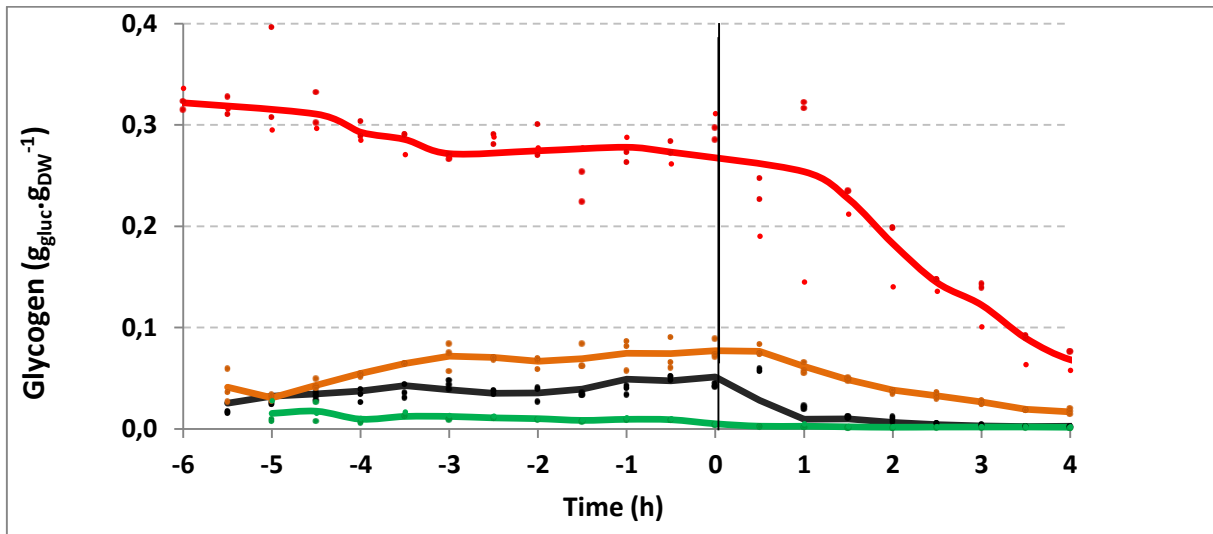


Figure 1: CSR mutants' behaviors during the glucose-acetate transition. Cultures were followed from 6 hours before glucose exhaustion to 4 hours after. Glucose exhaustion was set up as time 0. All the replicates data are displayed as dots and the fitted average values for each strain as a line. WT (black circles); $\Delta csrBC$ (green squares); $\Delta csrD$ (orange triangles); $csrA51$ (red diamonds). **1A.** Biomass concentration (gram of cell dry weight per liter). **1B.** Extracellular glucose concentration in mM. **1C.** Extracellular acetate concentrations in mM. **1D.** Glycogen intracellular content in gram of glucose per gram of cell dry weight.

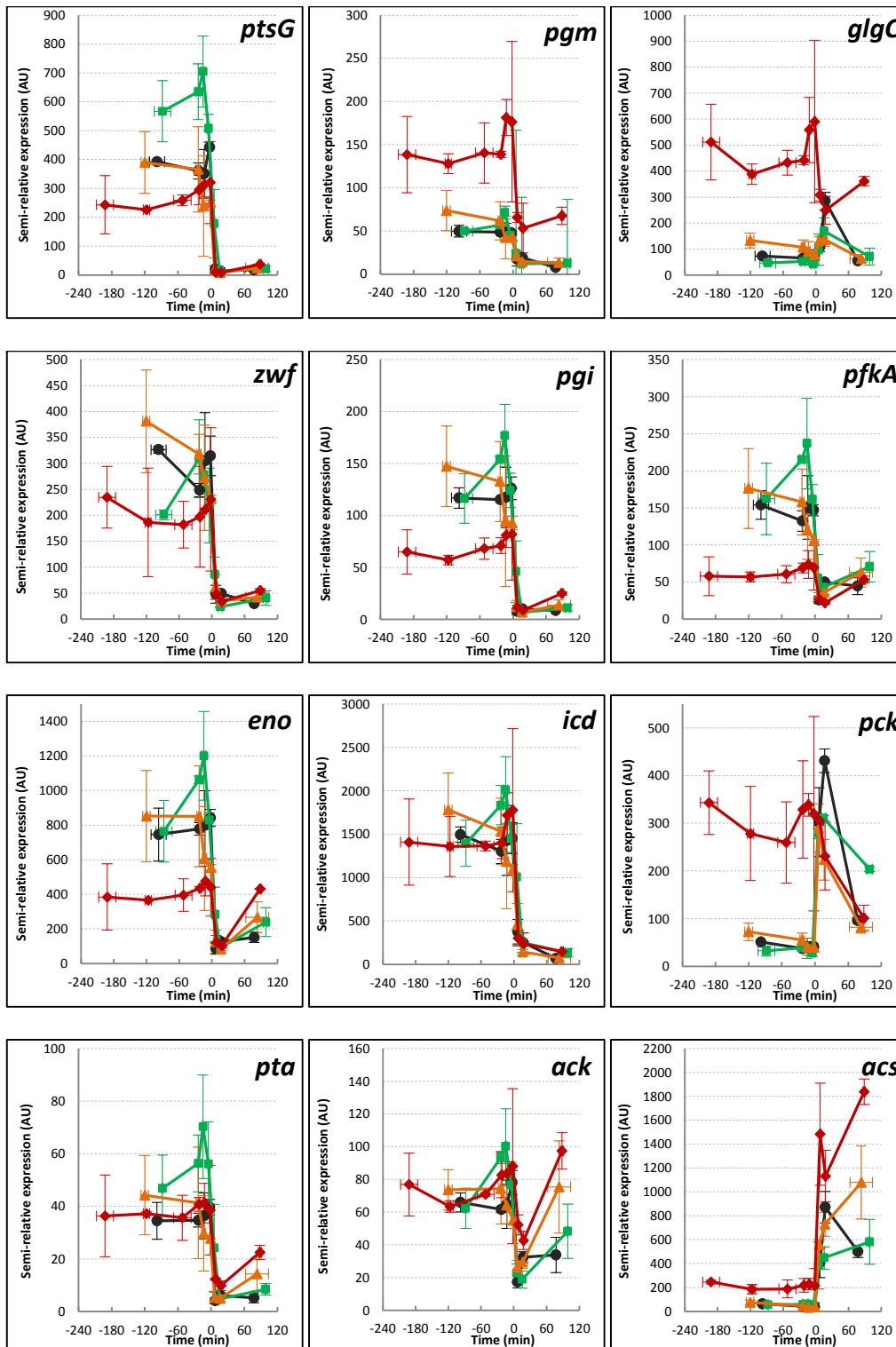
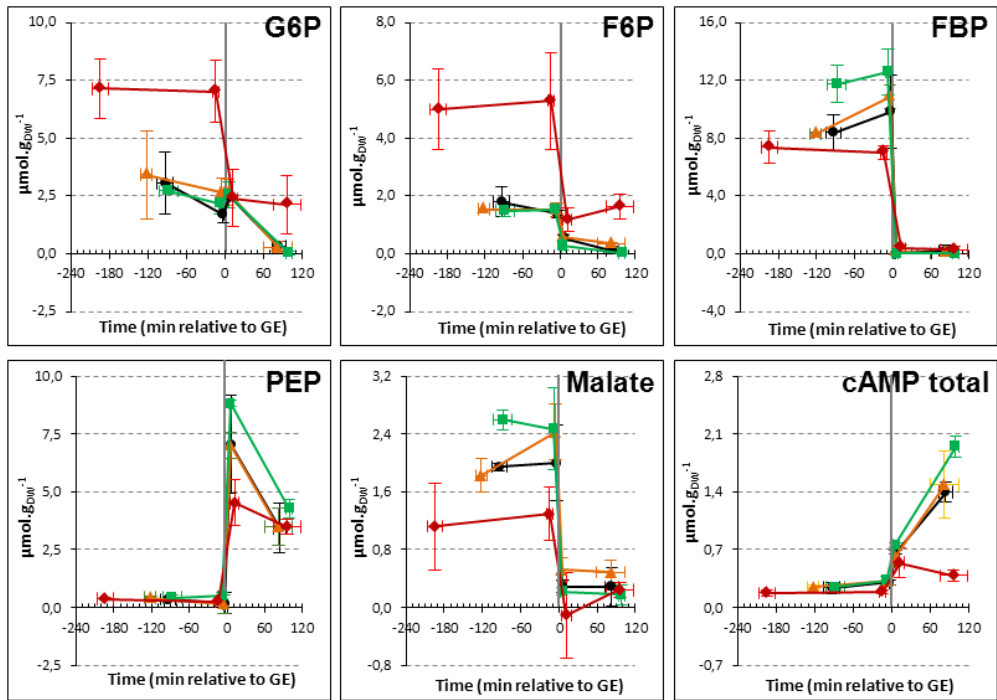


Figure 2: Expression of key metabolic genes throughout the glucose-acetate transition of CSR mutants. Transcript levels (relatively to the *idnT* RNA reference) were investigated from 3 hours before glucose exhaustion to 2 hours after. WT (black circles); $\Delta csrBC$ (green squares);

$\Delta csrD$ (orange triangles); *csrA51* (red diamonds). *ptsG*: glucose PTS permease-PtsG subunit (EG10787); *pgm*: phosphoglucomutase (EG12144); *glgC*: glucose-1-phosphate adenyltransferase (EG10379); *zwf*: glucose 6-phosphate-1-dehydrogenase (EG11221); *pgi*: phosphoglucose isomerase (EG10702); *pfkA*: phosphofructokinase (EG10699); *eno*: enolase (EG10258); *icd*: isocitrate dehydrogenase (EG10489); *pck*: phosphoenolpyruvate carboxykinase (EG10688); *pta*: phosphate acetyltransferase (EG20173); *ack*: acetate kinase (EG10027); *acs*: acetyl-coA synthetase (EG11448).

A.



B.

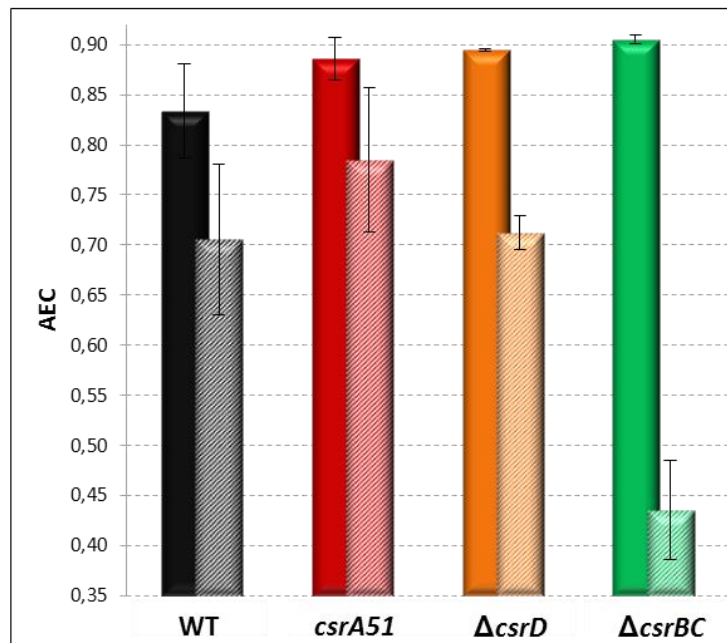
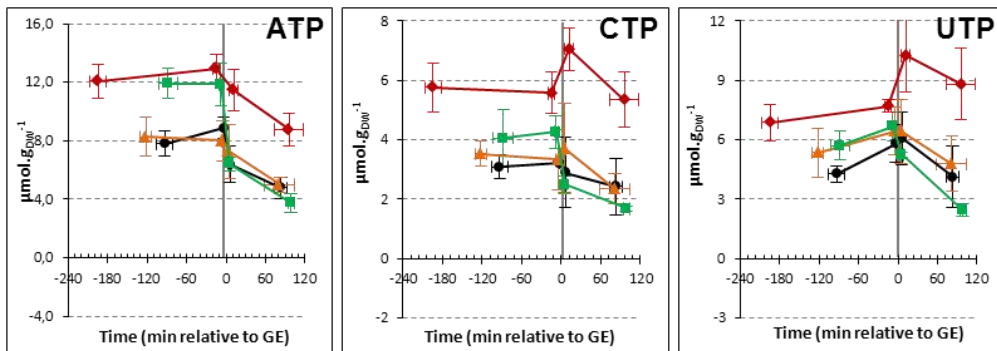
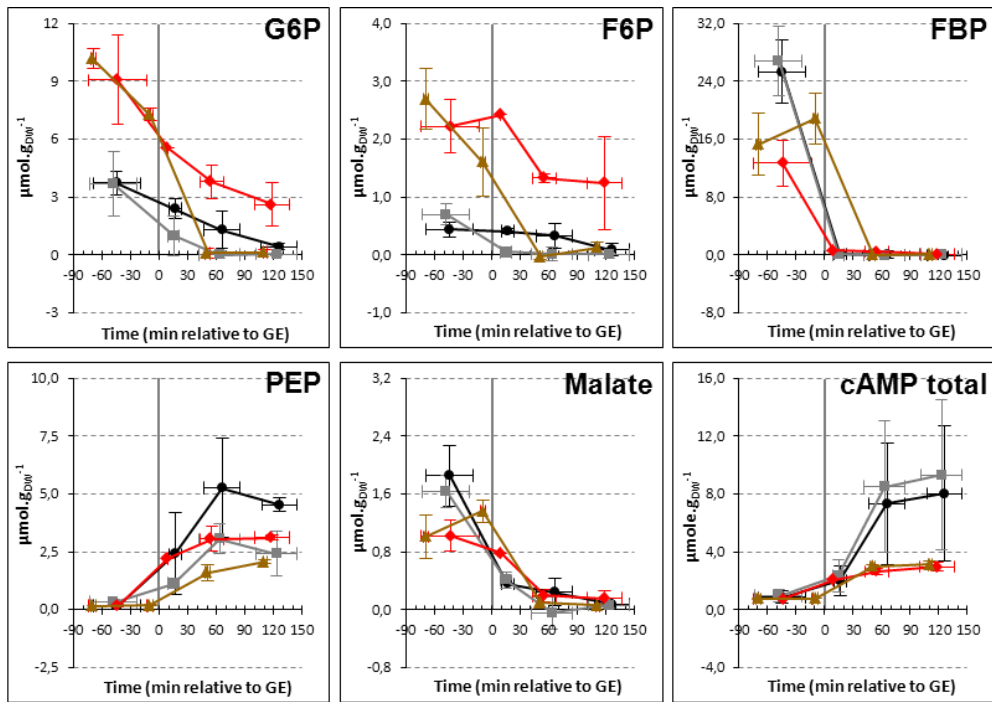


Figure 3: Concentrations of key central carbon metabolites throughout the glucose-acetate transition of CSR mutants. 3A. Metabolite concentrations were investigated from 3 hours before glucose exhaustion to 2 hours after. WT (black circles); $\Delta csrBC$ (green squares); $\Delta csrD$ (orange triangles); *csrA51* (red diamonds). G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose 1,6-biphosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; cAMP: adenosine 2',3'-cyclic monophosphate; CTP, cytidine-triphosphate; UTP, uridine-triphosphate; ATP, adenosine-triphosphate. **3B.** Adenylate energetic charge (AEC) for the same four strains during glucose consumption (plain bars) and 1.5 hour after glucose exhaustion (striped bars).

A.



B.

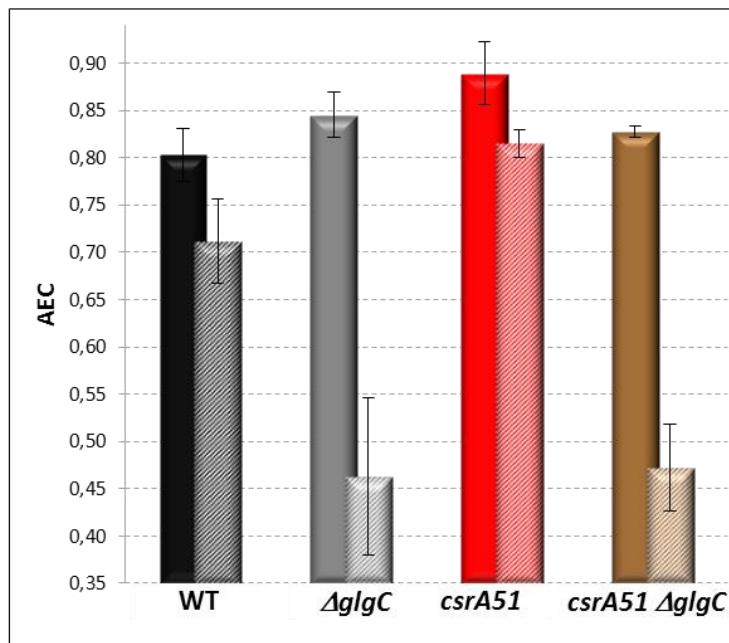
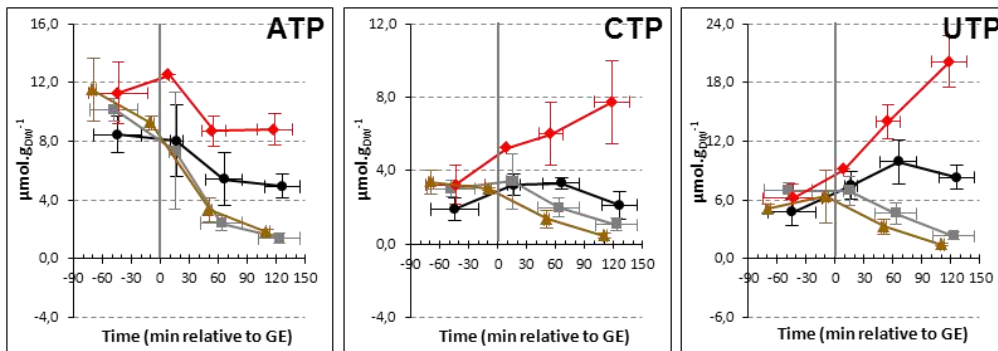


Figure 4: Concentrations of key central carbon metabolites throughout the glucose-acetate transition of CSR and/or glycogen-deficient mutants. 3A. Metabolite concentrations were investigated from 3 hours before glucose exhaustion to 2 hours after. WT (black circles); $\Delta glgC$ (grey squares); *csrA51* (red diamonds); *csrA51* $\Delta glgC$ (brown triangles). G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose 1,6-biphosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; cAMP: adenosine 2',3'-cyclic monophosphate; CTP, cytidine-triphosphate; UTP, uridine-triphosphate; ATP, adenosine-triphosphate. **3B.** Adenylate energetic charge (AEC) for the same four strains during glucose consumption (plain bars) and 1.5 hour after glucose exhaustion (striped bars).

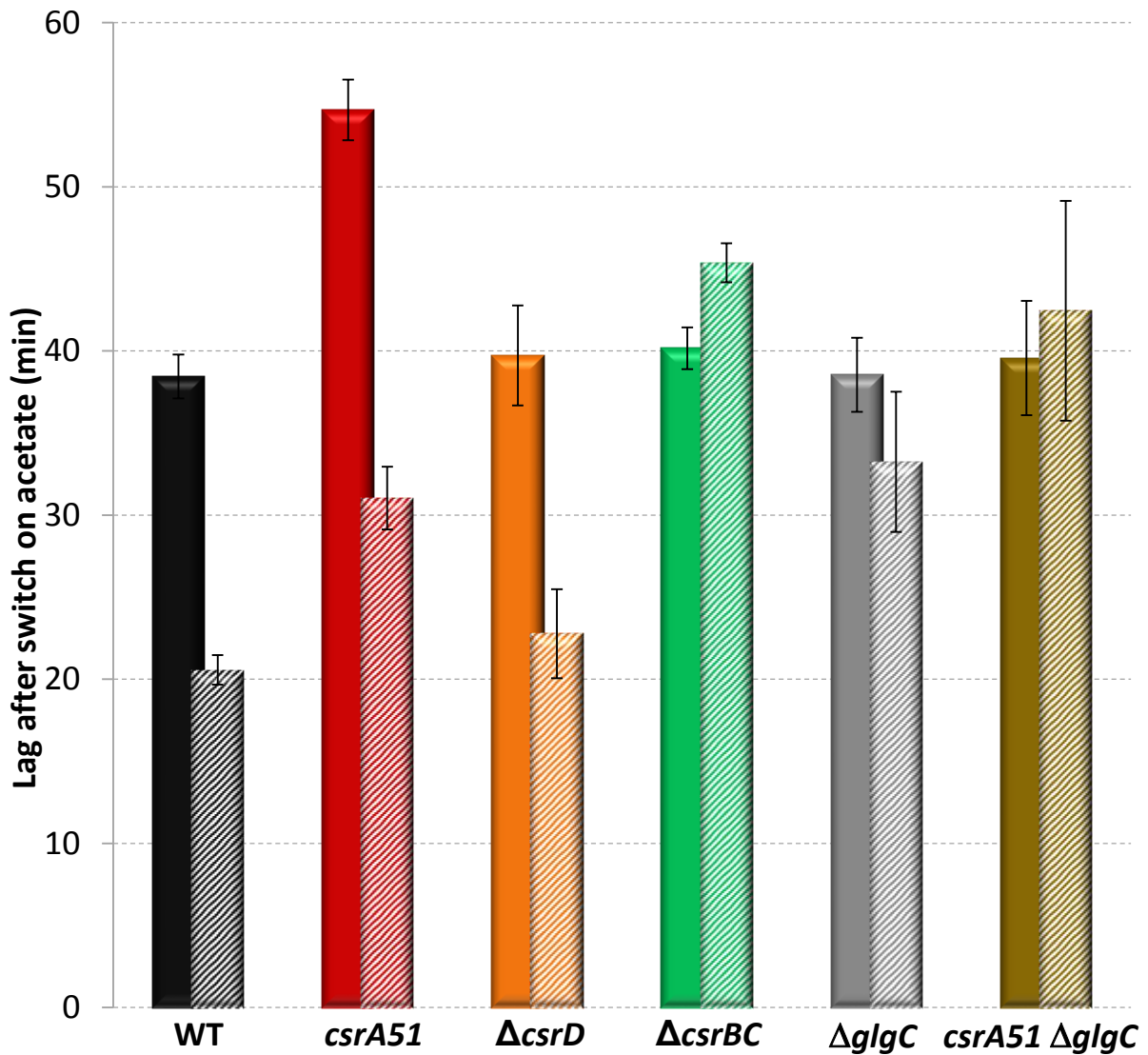


Figure 5: Lag to set up full growth rate on acetate. For each strain, cells from a mother culture on M9-glucose were switched to M9-acetate and the lag time to attain full growth on the new substrate was measured. Cells were either sampled 60 to 10 minutes before glucose exhaustion (plain bars) or 40 to 60 minutes after (striped bars). The data correspond to the average of three or more independent biological replicates. WT (black), *csrA51* (red), $\Delta csrD$ (orange), $\Delta csrBC$ (green), $\Delta glgC$ (grey) and *csrA51* $\Delta glgC$ (brown).

CHAPITRE 3

**Rôle de la stabilité des ARNm dans la
régulation de l'expression génique au cours de
l'adaptation métabolique chez *E. coli***

L'ajustement des pools d'ARNm constitue le premier niveau de régulation de l'expression génique lors de l'adaptation. Ces modifications de concentration découlent d'une régulation de leur transcription et/ou de leur dégradation. L'implication du régulateur post-transcriptionnel CSR dans la régulation de l'adaptation métabolique a été mise en évidence dans le chapitre précédent, mais ce système ne régule pas la concentration des ARNm du métabolisme carboné central (MCC) durant l'adaptation. Ceci n'exclut cependant pas l'absence totale d'implication de CSR dans la régulation de la concentration d'autres ARNm et de leur stabilité. Afin de le vérifier et de caractériser le rôle de CSR dans la régulation de la stabilité des ARNm au cours de l'adaptation il est nécessaire de connaître l'évolution de la stabilité des ARNm chez *E. coli* et sa contribution à la régulation des pools d'ARNm. Un tel travail a été effectué chez *Lactococcus lactis* (Dressaire *et al.*, 2013; Redon *et al.*, 2005). Il a mis en évidence une stabilisation générale des ARNm et l'importance de ce contrôle dégradationnel sur les pools d'ARNm lors de l'adaptation à une carence en nutriments. Aucune étude de ce genre n'a été effectuée chez l'organisme modèle *E. coli*.

Ce chapitre a donc pour objectif de caractériser l'évolution de la stabilité des ARNm ainsi que sa contribution à l'ajustement des pools d'ARNm lors d'une adaptation métabolique chez *E. coli*. Nous avons choisi la transition glucose-acétate (Enjalbert *et al.*, 2013, 2015; Kotte *et al.*, 2010; Wolfe, 2005) suivie d'une phase de carence carbone comme modèle d'étude. Cette dernière se caractérise par une première phase de croissance exponentielle sur glucose suivie d'une phase de consommation d'acétate et enfin d'une phase de carence carbone (après épuisement de l'acétate).

Des données du stabilome (temps de demi-vie de l'ensemble des ARNm) ont été produites à différents stades de la culture : (1) phase exponentielle de croissance sur glucose, (2) disparition du glucose, (3) phase de consommation d'acétate, (4) phase de carence. Ceci nous a permis de caractériser en dynamique l'évolution de la stabilité des ARNm. Dans un premier temps, nos analyses ont mis en évidence une stabilisation générale des ARNm en corrélation avec la diminution des ressources carbonées disponibles. Une comparaison « pas à pas » des différents stabilomes a montré que la stabilisation des ARNm est significative uniquement lors de la disparition du glucose.

La production de données du transcriptome (concentration de l'ensemble des ARNm) pour ces quatre mêmes temps de culture a mis en évidence une diminution progressive de la concentration globale des ARNm. Ceci n'exclut cependant pas la présence de gènes dont l'expression augmente au moment de la disparition du glucose ou de la phase de carence. En combinant les données des transcriptome et de stabilome, nous avons déterminé la contribution de la variation de la stabilité des ARNm à la variation des concentrations de ces ARNm. Une approche de calcul de coefficients de régulation a permis de calculer deux coefficients : ρ_T (coefficient transcriptionnel) qui représente la contribution de la transcription sur la variation d'un pool d'ARNm et ρ_D (coefficient dégradationnel) qui représente la contribution de la variation de la stabilité. Ainsi, on parle : de gènes sous contrôle transcriptionnel dès lors que la variation de concentration d'ARNm est majoritairement dirigée par la variation de transcription, de gènes sous contrôle dégradationnel dès lors que la variation de concentration d'ARNm est majoritairement dirigée par la variation de stabilité, et de contrôle partagé dès lors que la variation de concentration d'ARNm est équitablement dirigée par la transcription et la stabilité de l'ARNm. Cette approche a montré qu'au cours de la culture, les gènes sont majoritairement sous contrôle transcriptionnel malgré un effet antagoniste de la stabilisation des ARNm. Cependant, jusqu'à 20% des gènes sont sous contrôle dégradationnel au moment de l'adaptation métabolique. Notamment, au moment de la disparition du glucose, nous avons trouvé parmi les gènes surexprimés suite à leur stabilisation, de nombreux facteurs de transcription associés à la régulation de métabolismes carbonés alternatifs à celui du glucose (ex : *mlc*, *malt*) et à la réponse à différents stress environnementaux (ex : *rpoS*, *rpoH*) ainsi que des gènes associés à la régulation de l'activité cellulaire en l'absence de croissance. Ceci témoigne du rôle non négligeable des régulations de la stabilité des ARNm dans l'adaptation métabolique. Finalement, les régulateurs transcriptionnels Crp et ppGpp, le facteur σ^S (RpoS), le taux de croissance et le régulateur post-transcriptionnel CsrA sont des mécanismes très probablement impliqués dans le contrôle transcriptionnel ou dégradationnel (pour CsrA) au moment de la disparition du glucose et de l'acétate car plusieurs de leurs cibles connues ont été retrouvées parmi les gènes sous contrôle transcriptionnel ou dégradationnel (pour CsrA).

Ces travaux apportent de nouvelles informations concernant l'évolution de la stabilité des ARNm et l'importance de ces régulations dégradationelles lors de l'adaptation d'*E. coli*. Le contrôle de la stabilité des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress permettrait une réponse plus rapide et moins coûteuse en énergie que l'activation de leur transcription. Cette découverte souligne l'importance de la stabilité des ARNm dans l'adaptation d'*E. coli*. Ces travaux feront l'objet d'une soumission à une revue à comité de lecture, dont voici ci-après le manuscrit en préparation.

Global analysis of gene expression during a metabolic transition reveals a role of degradational control in bacterial adaptation

Manon MORIN^{1,2,3,4}, *et al.*

¹ Université de Toulouse; INSA, UPS, INP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

² INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, LISBP, F-31400 Toulouse, France.

³ CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France.

⁴ Inria Grenoble-Rhône-Alpes. 655 avenue de l'Europe, 38334 Montbonnot Cedex. France

Keywords: Metabolic adaptation/Gene expression/ RNA stability/ *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Bacteria have to continuously adapt to nutrient supply changes. Fine-tuning of mRNA pools constitutes the first level of gene expression regulation required for such metabolic adaptation. They result from both mRNA transcription and degradation controls. Whereas transcriptional regulations are known to be deeply involved in gene expression regulation during metabolic adaptation, several observations underline a potential role of degradational control. Using combined transcriptome and mRNA decay analysis approaches, we investigated such regulations in *E. coli* using the model metabolic transition glucose-acetate followed by a starvation phase. Our work highlighted that mRNA half-life is negatively correlated to carbon availability. Most of gene expression re-organization is under transcriptional control and the largest changes occur when the cells run out of glucose even if acetate is consumed. Looking for specific regulators, we conclude that global regulators are likely to be involved in both transcriptional and degradational control at glucose and acetate exhaustion. Interestingly, the degradational control mainly targets stabilization of transcriptional factors involved in adaptive response. This suggests that *E. coli* has established a strategy to initiate adaptation more rapidly and at lower energetic cost. Thus, this work highlights the importance of mRNA stability regulation in bacterial adaptation.

INTRODUCTION

Bacteria have to face multiple environmental changes and continuously adapt their physiological and metabolic status by regulating gene expression. The different levels of regulation include mRNA concentration modification, protein concentration modification as well as protein activity regulation.

mRNA pools result from transcription and mRNA decay plus mRNA dilution whenever the cells are dividing. Their regulation constitutes the first level of gene expression regulation. Previous large scale studies of mRNA decay across the bacterial world highlighted that the average half-life of mRNA during exponential growth is less than 10 minutes whereas the doubling time was more than an hour (Chen *et al.*, 2015; Dressaire *et al.*, 2013; Esquerré *et al.*, 2014; Redon *et al.*, 2005; Rustad *et al.*, 2013). Consequently, mRNA pools depend mostly on transcription and mRNA degradation and thus on transcriptional and post-transcriptional regulations. Both regulations are associated to global regulation by the growth rate (Bremer and Dennis, 1996; Chen *et al.*, 2015; Dressaire *et al.*, 2013; Esquerré *et al.*, 2014; Redon *et al.*, 2005) as well as specific regulations.

Transcriptional regulations have largely been characterized in different adaptive responses to environmental stimuli and stresses (for example: Crp regulates the adaptation to alternative carbon sources (Deutscher, 2008), RpoS (σ^S) regulates the general stress response (Hengge-Aronis, 1996) or ArcA regulates the adaptation to redox environments (Gunsalus and Park, 1994)). Whereas post-transcriptional regulations have also been shown to be involved in the regulation of the adaptation (Takayama and Kjelleberg, 2000), they are not yet fully characterized. Redon *et al.* (2005) demonstrated the role of mRNA stability control (*i.e* degradational control) on gene expression during adaptation to carbon starvation in *Lactococcus lactis* but no such study has been carried out on the model organism *Escherichia coli*.

Here, we investigated the contribution of the regulation of mRNA stability on gene expression during the adaptation of *E. coli* to carbon availability. First, the evolution of mRNA stability during adaptation was investigated by mRNA decay analysis (stabilome analysis).

Then, by combining this approach to transcriptome analysis, we examined how the regulation of mRNA stability contributes to mRNA pool modifications. The glucose-acetate transition (Enjalbert *et al.*, 2013, 2015; Kotte *et al.*, 2010; Wolfe, 2005) followed by a starvation phase have been used as the adaptation model. Previous works concerning the glucose-acetate brought information about gene expression and transcriptional regulations and discussed possible involvement of post-transcriptional control (Pernestig *et al.*, 2003; Wolfe, 2005).

Here, we showed that the re-organization of gene expression happens mostly at glucose exhaustion and is largely under transcriptional control. However, our work points out a central role of degradational control on bacterial adaptation as genes significantly stabilized during the transition are the ones coding for specific transcriptional regulators. This observation opens new perspectives for adaptive mechanisms studies.

RESULTS

mRNA stability increases along the glucose-acetate-starvation culture

The glucose-acetate-starvation culture was characterized by a progressive decrease in carbon availability until complete starvation and an increased stress status of the cells. The culture can be divided into three phases (P1, P2 and P3 on Figure 1). P1 was characterized by an exponential growth on minimum medium supplemented with glucose (15mM) and the production of 4mM of acetate. The cells grew with a maximum growth rate of 0.57h^{-1} and had a glucose consumption rate of $8.1\text{ mmol}_{\text{GLC}}/\text{h}/\text{g}_{\text{DW}}$. Once the glucose was fully consumed, the growth stopped and the cells instantly started to consume the acetate at a rate of $1.14\text{ mmol}_{\text{ACE}}/\text{h}/\text{g}_{\text{DW}}$ (P2, Figure 1). Whereas carbon was available no growth was observed as already mentioned in Enjalbert *et al.* (2013). The cells finally ran out of acetate and faced a carbon starvation phase P3 (Figure 1).

To investigate the evolution of mRNA stability during a glucose-acetate-starvation culture, mRNA half-lives ($t_{1/2}$) have been calculated at four representative time points (i.e conditions) of the culture: exponential growth on glucose (Expo - 1 on Figure 1), glucose

exhaustion (G-Exhaustion – 2 on Figure 1), Acetate consumption phase (A-consumption – 3 on Figure 1) and carbon starvation phase (C-Starvation – 4 on Figure 1). The $t_{1/2}$ were determined by using a microarray-based analysis and calculation was considered reliable according to a statistical criteria on the coefficient of variation (cv) related to the degradation constant (see materials and methods section). We used a global model with linear regression to accurately determine the $t_{1/2}$ of 4254 mRNAs and the associated cv by taking into account all conditions.

The number of reliable mRNA $t_{1/2}$ decreased strongly along the culture (Figure 2A). Whereas 81 % (3456 mRNAs) of the complete mRNA set displayed a good cv , only 34% and 32 % were reliable for A-Consumption and C-Starvation conditions respectively. We noticed that the unreliability of our calculation was mostly associated with low mRNA concentrations and was thus probably related to technical reasons (Supplementary data S1). 725 mRNAs displayed a reliable $t_{1/2}$ in all conditions, the 3529 others displaying a too low concentration to calculate the $t_{1/2}$ for at least one condition. For these common 725 mRNAs a global increase of mRNA stability has been observed along the growth by analyzing the distribution of mRNA $t_{1/2}$ for each condition (Figure 1B). During the exponential growth, the median $t_{1/2}$ was 3.1 minutes (Expo) accordingly to previous works (Bernstein *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2015; Esquerré *et al.*, 2014). mRNA $t_{1/2}$ doubled at glucose exhaustion with a median of 6.3 minutes (G-Exhaustion), increased to 8.3 minutes during acetate consumption phase (A-Consumption) and to 9.5 minutes at the starvation phase (C-Starvation). This stabilization tendency was confirmed and reinforced by analyzing the distribution of reliable $t_{1/2}$ for each condition (Supplementary data S2).

In conclusion mRNA stability globally increased along the culture in correlation to the progressive decrease in carbon availability.

A step by step analysis confirms mRNA stabilization along the culture and highlights major stabilization at glucose exhaustion

Since the global mRNA stability appeared to increase along the culture, we aimed to investigate the dynamic evolution of mRNA $t_{1/2}$ for each individual mRNA. We carried out a

step by step approach by comparing for each mRNA its half-life between two consecutive conditions to dynamically analyze mRNA stability.

Between G-Exhaustion and Expo 2321 mRNAs had a reliable $t_{1/2}$, 1363 between A-Consumption and G-Exhaustion and 873 between C-Starvation and A-Consumption. 73% of the analyzable mRNAs between Expo and G-Exhaustion (representing 1694 mRNAs) displayed significantly different $t_{1/2}$ (Mann-Whitney statistical test: P-value < 10%) (Figure 3A). The stability of only one mRNA (*rpiB*) significantly changed between A-consumption and G-Exhaustion whereas no significant difference in mRNA $t_{1/2}$ was found thereafter. Consequently, mRNA significant $t_{1/2}$ modifications appeared to happen when cells run out of glucose and growth stopped. Most of the further investigations will then be carried out on the comparison of G-Exhaustion and Expo.

Between G-Exhaustion and Expo, only 3 mRNAs had a $t_{1/2}$ ratio inferior to 1 and thus were destabilized. These mRNAs were respectively associated to the genes *yfeW* coding for a penicillin binding protein 4B, *yhaO* coding for a putative transport protein of the hydroxyl/aromatic and permease family and *rpiB* coding for the allose 6-phosphate isomerase/ribose 5-phosphate isomerase B. *rpiB* was then stabilized between A-Consumption and G-Exhaustion. Even if the $t_{1/2}$ of *yhaO* and *yfeW* could not be precisely quantified at A-Consumption, the same evolution towards stabilization was expected (Supplementary data file S3). Therefore, these mRNA destabilization appeared to be temporary and specific to the transition between exponential phase and glucose exhaustion. However, according to the literature, these three genes did not share apparent characteristics in terms of function, regulation or gene localization (Keseler *et al.*, 2013). This prevented to either establish a relation between them or explain their peculiar half-life evolution.

A large majority of the mRNAs with modified stability between G-Exhaustion and Expo (1694) were stabilized and displayed $t_{1/2}$ ratio from 1.5 to 12.3 (average stabilization of 3.3). The distribution of the stabilized mRNA $t_{1/2}$ ratio is represented in Figure 3B. 75% of the genes were associated to a ratio between 1.44 and 3.83. A functional enrichment analysis using the Biological Process of Gene Ontology annotation database (Harris *et al.*, 2004) highlighted that the most enriched function was “negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic

process” which is associated to genes involved in any process that stops, prevents, or reduces the frequency, rate or extent of cellular macromolecule biosynthetic process (Figure 3C). Biosynthetic processes are known to be correlated to growth rate and thus to decrease whenever growth rate decreases (Bremer et Dennis, 1996). Between G-Exhaustion and Expo, cells are actually facing carbon availability and growth modification. Moreover, the functions “negative regulation of gene expression” and “transcription DNA dependent” were also highly enriched as well as the function “SOS response”. By identifying these mRNAs we dug out numerous transcriptional factors such as Crp, FNR, Mlc, H-NS, LexA or MalT as well as some sigma factors (σ^S , σ^{32} and σ^E). These regulators are known to regulate gene expression during environmental adaptation and especially response to nutrient availability and growth modifications. Thus, the functional enrichment analysis pinpointed that the stabilization mainly concerns mRNAs related to cell response to glucose exhaustion and growth arrest. Concerning the mRNAs displaying a ratio superior to 3.83 and which we can consider as strongly stabilized, the functional enrichment analysis highlighted the presence of mRNAs associated to tRNA post-transcriptional modifications (Supplementary data S4). Such modifications are known to be involved in tRNA stability and in translation re-programming in response to environmental stress, especially temperature changes (Agris *et al.*, 2007; Helm and Alfonzo, 2014; Motorin and Helm, 2010). Again, mRNA stabilization appeared to mostly concern genes involved in bacterial adaptation.

In conclusion, differences in mRNA stability were mostly found between G-Exhaustion and Expo and the great majority of them corresponded to stabilization. The stabilized genes appeared to be involved in programming cell response to glucose exhaustion and growth arrest. Interestingly most of mRNAs corresponded to transcriptional regulators controlling the specific adaptive response.

Transcriptome analysis highlights a progressive decrease in mRNA concentration along the glucose-acetate-starvation culture

So far, we have demonstrated that the mRNA stability changes along the culture. To examine whether these modifications impact mRNA levels and thus gene expression, the evolution of the mRNA concentration has to be preliminarily characterized by a transcriptome analysis.

A transcriptome analysis has been performed by using the data generated for each TO sample (before the addition of rifampicin) for each condition. Intensity values have been multiplied by the total extraction yield ($\mu\text{g}_{\text{total RNA}}/\text{mg}_{\text{DW}}$) to obtain the mRNA concentrations in arbitrary unit/ mg_{DW} (see materials and methods section). The repartition of the 4254 mRNA concentration for each condition (Figure 4A.) highlighted a global decrease of mRNA concentration until A-Consumption.

To dynamically study the evolution of each mRNA concentrations, a step by step analysis has been performed by comparing mRNA concentrations between two consecutive conditions. Significant differences in mRNA concentration were determined by statistics based on a Benjamini and Hochberg p-value and the variation of the fold-change (see materials and methods section). The volcano plots presented in Figure 4B display up-regulated genes in red ($p\text{-value}<1\%$ and $\log\text{FC}<-0.5$) as well as down-regulated genes in green ($p\text{-value}<1\%$ and $\log\text{FC}>-0.5$) for each comparison. Between G-Exhaustion and Expo, 2426 genes were down-regulated and 581 were up-regulated. Up-regulated genes at glucose exhaustion were mainly associated to alternative carbon sources transport and metabolism (Functional enrichment analysis – Supplementary data 5A). Between A-Consumption and G-Exhaustion the number of up-regulated genes was reduced to 41 whereas 2427 genes were down-regulated. Compared to the other comparisons, the number of mRNAs which concentration significantly changed between C-Starvation and Acetate was smaller: 501 down-regulated genes and 371 up-regulated ones. The up-regulated genes during starvation were associated to cell response and persistence during stress conditions (Functional enrichment analysis – Supplementary data 5B).

To conclude, the transcriptome analysis highlights a general decrease of mRNA concentrations and the down-regulation of gene expression along the culture. However, specific up-regulations occur in response to carbon supply changes. The metabolism of alternative carbon sources appears to be activated when cells run out of glucose, whereas preparation for the cell survival during starvation occurred when cells have emptied carbon resources.

mRNA stability controls mRNA pools of genes and transcriptional factors involved in cell response to glucose exhaustion.

The changes of mRNA concentration previously observed result from transcription modification and/or mRNA stability variation. We investigated the contribution of mRNA stability modifications to mRNA pools variation along the culture by carrying out a regulatory analysis as described in Esquerre *et al.*, (2014) and in the materials and methods section. For each mRNA pool variation between two conditions we calculated the associated degradational (ρ_D) and transcriptional coefficients (ρ_T). According to the equation (2) (see materials and methods section): $\rho_D \left(-\frac{d \ln k}{d \ln [RNA]} \right)$ and $\rho_T \left(\frac{d \ln V_t}{d \ln [RNA]} \right)$ and k is the degradation rate, $[RNA]$ the mRNA concentration and V_t the transcription rate. The degradational coefficient ρ_D represents the contribution of mRNA stability variation to mRNA pool modifications whereas the transcriptional coefficient ρ_T represents the contribution of transcription modifications.

The control analysis has been performed only on mRNAs with a reliable half-life. For each comparison, the set of mRNAs was the one defined during the mRNA stability step by step analysis (2321 mRNAs between G-Exhaustion and Expo, 1363 between A-Consumption and G-Exhaustion and 873 between C-Starvation and A-Consumption). Moreover according to the mathematical definition of ρ_D and ρ_T a small variation of $\ln k$ or of $\ln [RNA]$ can lead to extreme values of ρ_D and mistakes in the biological interpretation. It has been decided not to determine the control coefficients for mRNAs included in the lowest 5% of $d \ln k$ or $d \ln [mRNA]$ for each comparison. Furthermore, only mRNAs whose concentration changes were significant (p -value from the transcriptome analysis $< 1\%$) were analyzed since the regulation coefficients characterize significant mRNA variations. Therefore the sets of mRNAs were reduced to 2102 mRNAs for the G-Exhaustion vs Expo comparison, 1209 mRNA for the A-

Consumption vs G-Exhaustion comparison and to 603 mRNAs for the C-Starvation vsA-Consumption comparison.

Five regulatory classes have been defined according to the ρ_D value. In classes I and II, mRNA concentration is under transcriptional control with either opposite degradational control (Class I: $\rho_T > 1$ and $\rho_D < 0$) or co-directional degradational control (Class II: $0.6 < \rho_T < 1$ and $0 < \rho_D < 0.4$). Class III regrouped mRNAs whose concentration is equally transcriptionally and degradationally controlled. In classes IV and V, mRNA concentration is under degradational control with either co-directional transcriptional control (Class IV: $0.6 < \rho_D < 1$ and $0 < \rho_T < 0.4$) or opposite transcriptional control (Class V: $\rho_D > 1$ and $\rho_T < 0$). Class I was the most represented among the different comparisons (Figure 5A), highlighting a global transcriptional control of mRNA pools whereas mRNA stability tended to antagonize it. This correlates with the global decrease of mRNA concentration despite a global increase in mRNA $t_{1/2}$. 84% of the mRNA pool variation between G-Exhaustion and Expo was under transcriptional regulation, as well as 91% between A-Consumption and G-Exhaustion and 76% between C-Starvation and A-Consumption. Degradational control regulated 14 % of differentially expressed mRNA between G-Exhaustion and Expo, 7% between A-Consumption and G-Exhaustion and increased to 19% between C-Starvation and A-Consumption.

Most of the mRNAs (73% or 208 mRNAs) under degradational control between G-Exhaustion and Expo were associated to up-regulated mRNA concentration ($\log_{FC} > 0.5$) (Figure 5B). Interestingly we noticed that these mRNA displayed a $t_{1/2}$ ratio between 2 and 3. This suggested that the doubling of mRNA half-life has a non-negligible impact on the mRNA concentration. A functional enrichment analysis has been performed on these mRNAs. The most enriched function was “glycine betaine biosynthetic process from choline” which corresponds to a protective mechanism against high external osmolarity. However the function “regulation of transcription- DNA dependent” appeared to be the second most enriched function in the group of genes under degradational control (Figure 5C). 40 genes coded for known or putative transcription factors or sigma factors involved in the response to stress (ex: *fliA*, *rpoH*, *rpoS*, *hns*, *soxR*) or in alternative metabolisms (ex: *malt*, *lacl*, *rhaR*). Functions as “transcription initiation from bacterial-type RNA polymerase promoter” and

“negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process” were also enriched. This demonstrated that the stabilization of mRNAs related to stress response observed earlier actually triggers the up-regulation of these genes and strengthened the hypothesis of a crucial role of degradational control in cell adaptation.

Repartition of degradational control between A-Consumption and G-Exhaustion and between C-Starvation and A-Consumption was very different. In fact, more than half of the observed degradational regulations were related to small mRNA concentration changes ($\log FC \in [-0.5; 0.5]$). More surprisingly, up to 33% of mRNAs (= 30 mRNAs) under degradational control between A-Consumption and G-Exhaustion were associated to down-regulated mRNA pools (List of genes in Supplementary data S6). Reminding that no significant mRNA half-life modifications were found between A-Consumption and G-Exhaustion, this suggested that even little $t_{1/2}$ variations could have a noticeable impact on mRNA concentration. Enrichment analysis on mRNAs under degradational regulation between A-Consumption and G-Exhaustion and between C-Starvation and A-Consumption did not bring many reliable enriched functions or relevant ones (Supplementary data file S7).

In conclusion, gene expression regulation is mostly under transcriptional control during the glucose-acetate-starvation culture. However degradational control drove up to 20% of gene expression being either up-regulation, down-regulation or mRNA pool maintenance depending on the culture stage. More interestingly we demonstrated here that mRNA stabilization at glucose exhaustion and growth arrest drove the up-regulation of genes such as transcriptional and σ factors involved in transcriptional response to growth arrest as well as the up-regulation of genes involved in cell activity down-regulation. Some physiological responses to carbon availability may rely on the degradational control. This highlights both a direct and indirect influence of post-transcriptional regulation on gene expression and cell adaptation.

Degradational and transcriptional regulators coordinately control gene expression at glucose exhaustion.

Here we demonstrate that the degradational control plays a significant role in gene expression regulation in this culture and has to be taken into account in addition to transcriptional control. Both controls are supported by various mechanisms. Growth rate, the transcriptional regulators Crp and ppGpp, the sigma factor σ^S (RpoS) and the post-transcriptional regulator CsrA are global regulators known to support transcriptional or degradational control during adaptation (Berthoumieux *et al.*, 2013; Gerosa *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2006; Romeo *et al.*, 2013; Traxler *et al.*, 2006, 2011; Timmermans et Melderer 2010). Here we investigated whether and when these mechanisms were individually involved in observed transcriptional and degradational controls.

We defined the term “exclusive regulon” of a regulator as the group of genes regulated only by this regulator. Here, we looked for the presence of genes belonging to the exclusive regulon of growth rate, Crp, RpoS or ppGpp among the genes under transcriptional regulation and to the exclusive regulon of CsrA among the genes under degradational control. Exclusive regulons were obtained by removing all shared regulation (see materials and methods section for their determination and supplementary data S8). Up or down regulon correspond to either genes up-regulated by a regulator or down-regulated ones. To study the involvement of each regulator in gene expression regulation and in dynamic, we focused our analysis on the 725 genes whose $t_{1/2}$ was reliable during the entire culture in order to avoid sample bias. For each regulon and for each comparison, we determined the number of genes of the regulon present among up- or down-regulated genes under either transcriptional or degradational control and then compared this number to the size of the regulon among the 725 genes (expression in percentages) (Figure 6). As the size of the growth rate up-regulon (μ_{up}) and of the CsrA down-regulon (CsrA_down) was considered too small, these regulators have finally not been considered (Figure 6A).

For each regulon, the percentage of genes belonging to transcriptional or degradational genes was generally higher between G-Exhaustion and Expo than in the other comparisons (Figure 6C- plain bars). Thus, all regulators were involved in the control of gene

expression at the glucose exhaustion. During acetate consumption, these percentages strongly decreased except for transcriptional down-regulations (ppGpp_down regulon and Crp_down regulon) which appeared to increase (Figure 6C- stripped bars). Finally, except for RpoS_up and Crp_down, percentages increased during starvation. Here, almost all regulators appeared to be involved in the regulation of gene expression at acetate exhaustion albeit to a lower extent than at glucose exhaustion (Figure 6C- grid bars).

Using this approach we finally conclude that these transcriptional and degradational regulators coordinately act in the regulation of gene expression regulation essentially at glucose exhaustion and to a lower extent at acetate starvation. More particularly, the post-transcriptional regulator CsrA appeared to support degradational control at both glucose and acetate exhaustion.

DISCUSSION

To investigate *E. coli* mRNA stability and its contribution to the regulation of gene expression during the metabolic adaptation, we performed a transcriptome (mRNA concentration) and stabilome (mRNA half-life) analysis along the glucose-acetate-starvation culture, a transition representative of *E. coli* adaptation to carbon fluctuations in its environment.

Here, transcriptome data have been obtained for two metabolic adaptations whereas studies generally focused on one (Durfee *et al.*, 2008; Enjalbert *et al.*, 2013; Traxler *et al.*, 2006, 2011). We demonstrated that the reorganization of gene expression was less spectacular during the transition from acetate consumption to starvation than during the transition from glucose to acetate: 872 mRNAs presented significant changes in mRNA concentration between C-Starvation and A-Consumption against 3007 mRNAs between G-Exhaustion and Expo. In addition to genes belonging to alternative carbon metabolism, genes associated to stress response were also up-regulated at glucose exhaustion. We then can wonder if up-regulation of stress genes was an early step to adaptation to carbon starvation even if acetate was available. This being considered, the cell would be partly adapted to carbon starvation once

they run out of glucose. In recent work, Enjalbert *et al.* (2015) discussed that the absence of complete metabolic adaptation on acetate during a glucose-acetate transition (*i.e* no induction of acetate anabolism genes) could be a survival strategy to rapidly recover growth whenever a new better substrate appears. So it would seem that they are also prepared to face worst conditions.

For the first time, the evolution of mRNA stability has been characterized in *E. coli* during the adaptation to carbon availability. Technical issues have been met to reliably determine mRNA half-life for A-consumption and C-Starvation conditions. We supposed this was due to the very low mRNA concentrations observed in these conditions which generated unreliable $t_{1/2}$ values with our calculation method. Another experimental procedure might be used to specifically and separately analyze these conditions. For example we could consider diminishing the time interval between the sampling points for the stabilome analysis, especially in the early steps of the sampling, to improve the resolution of the analysis. Next-generation sequencing technologies could be considered as well. The global analysis showed an increase of mRNAs stability along the time as well as a decrease of mRNA concentration. Most of the significant modifications in both mRNA half-life and concentration happened when growth stopped. This demonstrated a strong dependence of mRNA concentration and mRNA half-life on growth rate as previously stated (Chen *et al.*, 2015; Esquerré *et al.*, 2014). These observations also agreed with similar statement in *Lactococcus lactis* (Dressaire *et al.*, 2013). However the fact that mRNA half-life kept increasing between A-Consumption and C-Starvation whereas the growth rates were null indicated a specific link between carbon availability and mRNA stability. If this observation had already been done for *L. lactis* (Redon *et al.*, 2005), it has never been investigated for *E. coli*. Global mRNA stabilization in response to nutrient starvation have also been observed in the bacteria *Vibrio angustum* (Albertson *et al.*, 1990) and *Rhizobium leguminosarum* (Thorne and Williams, 1997). Thus, mRNA stabilization in correlation with growth rate diminution as well as nutrients availability appeared to be likely a common mechanism across the bacterial world. Moreover, mRNA stabilization is also known to globally occur during lowering temperatures (thermic stress) or oxygen availability (hypoxic stress) (Rustad *et al.*, 2013). So, mRNA stabilization appears to be a generalized phenomenon in response to various stresses.

Combining transcriptome and stabilome data, we were able to quantify both transcription (transcriptional control) and mRNA stability (degradational control) effects on mRNA concentration and thus on gene expression. Since mRNA concentration and mRNA stability displayed contrary evolution along the culture, transcriptional and degradational controls were likely to have antagonistic effects on the regulation of gene expression. Our results showed that up to 85 % of gene expression was under transcriptional control counteracted by mRNA stabilization. We can conclude that gene expression was globally regulated through the regulation of the transcription during this metabolic adaptation despite the mRNA stabilization.

As expected, a number of genes under transcriptional control were identified as transcriptional targets of the catabolite repression (Crp), the growth rate, the stringent response (ppGpp) and the RpoS answer, highlighting a potential simultaneous involvement of these regulators on the regulation of gene expression during this metabolic adaptation. However, we noticed that the number of genes associated to specific regulations was small compared to the total number of genes under transcriptional control. Since we focused only on exclusive regulation and these regulators shared many targets, it is very likely that genes under transcriptional control were associated to shared regulations by at least two of the regulators, thus explaining the previous observation. We can also consider the involvement of other specific transcriptional regulators since many of them are known to regulate carbon metabolism (Martinez-Antonio, 2011; Perrenoud and Sauer, 2005). Interestingly, all regulations appeared to occur at the same moments except for transcriptional down-regulations by ppGpp and Crp. Once the growth stopped, transcription is strongly decreased in the cell (Bremer and Dennis, 1996). Then, we can wonder if the down-regulated genes between A-Consumption and G-Exhaustion or C-Starvation and A-Consumption really depend on transcriptional mechanisms such as transcription inhibition by ppGpp or Crp or if they simply are the consequence of a general absence of transcriptional activity and a progressive degradation of their mRNA pools. This last hypothesis being considered, Crp and ppGpp would mainly be supporting transcriptional control during metabolic adaptation (involvement in up-regulation at both glucose and acetate exhaustion). Surprisingly, whereas RpoS is known to be the regulator of stationary phase and stress conditions (Hengge-Aronis, 1996), no genes

under transcriptional control between C-Starvation and A-Consumption belonged to its regulon. Since RpoS targets were found among genes under transcriptional regulation until acetate consumption, this supports the idea of a partial adaptation to carbon starvation since acetate consumption.

Bernestein *et al.* (2002) suggested a possible involvement of mRNA stability in gene expression regulation during metabolic adaptation. Here, our work demonstrated that degradational control and thus mRNA stability regulation drove up to 19% of gene expression during adaptation. The proportion of degradational control appeared to remain stable along the culture. However the kind of degradational regulation (up- or down-regulation or maintenance of mRNA) and the genes under degradational control change along the culture. At glucose exhaustion, the degradational control led to mRNA up-regulation, whereas it mainly triggered down-regulation and mRNA pools homeostasis during acetate consumption and mRNA homeostasis during starvation. This demonstrates the importance, the specificity and the flexibility of degradational regulation. The CsrA protein, core of the CSR system (Romeo *et al.*, 1993), is a well-known RNA binding protein in *E. coli* (Van Assche *et al.*, 2015). Potential involvement of CsrA in mRNA stabilization has been found at both glucose and acetate exhaustion, thus underlying a possible role of the CSR system in gene expression regulation during metabolic adaptation. Enrichment analysis of each CsrA up_regulon among genes under degradational control would be a required statistic test to confirm these observations. Such statistical analysis would be also necessary for the transcriptional regulators analysis. Moreover, experimental validations would be required. For example, mRNA concentration and half-life evolution for genes belonging to CsrA up_regulon and under degradational control between G-Exhaustion and C-Starvation would have to be determined in a CSR mutant during a glucose-acetate-starvation culture to establish whether the degradational control is indeed CsrA dependent. The same experimental procedure would have to be developed for Δcrp , $\Delta rpoS$ and the $\Delta relA\Delta spoT$ strains. Other mechanisms sustaining degradational control remain to be determined. We could consider modifications of mRNA secondary structure or the involvement of other post-transcriptional regulators such as the global regulator Hfq. This regulator regulates mRNA stability and translation by facilitating sRNA binding to their target mRNA (Massé *et al.*, 2003). Investigating its

involvement would require looking for the regulon of each sRNA Hfq interacts with but the data is not yet available in the literature.

Interestingly transcription factors involved in the regulation of stress adaptation were the most represented category among the up-regulated genes under degradational regulation when cell run out of glucose and growth stopped. Hence, some transcriptional regulations must directly depend on degradational regulations. Furthermore, genes negatively controlling cell activity like macromolecule biosynthesis and thus controlling metabolic and physiological adaptation to growth arrest were highly represented among stabilized and up-regulated genes under degradation control. Stabilizing mRNAs would constitute a faster and less energy consuming response than their own transcription and thus a strategic way to favor adaptation. Adamson et Lim (2013) demonstrated that simple mechanisms of protein sequestration and RNA degradation constitute a rapid and robust way of signal propagation and delay reduction in the associated response. We can imagine that consequences are similar for mRNA stabilization. This brought new perspectives on degradational control importance on adaptation dynamic. As mRNA stability is negatively correlated to growth rate and to carbon availability, it could be considered as a “sensor” of metabolic state which then regulates the associated transcriptional and physiological responses. Now, the mechanisms behind these specific stabilizations have to be determined. Knowing the mechanisms would enable to shut them off and then analyze consequences on bacteria adaptation and quantify importance of mRNA stabilization during adaptation.

In conclusion, our work demonstrated that the mRNA stability increases during the metabolic adaptation to carbon progressive starvation. This counteracts transcriptional control on the decrease of the mRNA pool and sometimes even triggers mRNA up-regulation. This is particularly the case for transcriptional factors involved in cell adaptation. This observation sheds a new light upon the importance of post-transcriptional regulations so far ignored in bacterial adaptation.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture condition

E. coli K12 MG1655 was grown in bioreactors (BioStat B+ - Sartorius) in 1L of M9 minimum medium supplemented with 2.7g/L of *D*-glucose. All cultures were inoculated at an optical density of 0.2 after an overnight preculture. Three independent biological replicates were made for each condition of this study. The parameters remained the same for all batch cultures: stirring at 300rpm, pH 7, 37°C, and air flow at 1l.s⁻¹. These parameters were set and monitored using a Multifors bioreactor system (Infors, Switzerland). The evolution of the pO₂ was followed all along the culture. During the cultures, OD was measured every 30 minutes until the addition of rifampicin.

Extracellular and intracellular metabolites

Sampling for extracellular metabolites has been performed every hour since culture inoculation. The extracellular metabolites have been identified and quantified by using H+ HPLC (Agilent Technologies 1200 Series HPLC and Aminex HPX-87h column for acids and sugar separation). The analysis was carried out at 48°C using H₂SO₄ 5mM as an eluent.

The glucose and acetate consumption rate have been calculated according to the following equations:

$$q_{\text{GLU}} = \frac{d\text{GLU}}{dt} * \frac{1}{X} \quad \text{and} \quad q_{\text{ACE}} = \frac{d\text{ACE}}{dt} * \frac{1}{X} \quad \text{where } X \text{ represents the biomass concentration in g}_{\text{DW}}/\text{L}$$

Sampling and RNA extraction

Samples for transcriptome and stabilome analysis were collected at different stages of the culture (Figure 1). The samplings were performed at the following stages: at OD=2 during the exponential growth (Expo - 1 on Figure 1), 5 minutes after glucose exhaustion (G-Exhaustion - 2 on Figure 1), 1 hour after the glucose exhaustion during the acetate consumption phase (A-Consumption - 3 on Figure 1) and during the carbon starvation phase (C-Starvation - 4 on Figure 1). When the desired stage of the culture is reached 500µG/mL of

rifampicin is added to inhibit the initiation of the transcription (Campbell *et al.*, 2001). Then the equivalent of 5mg of cells were harvested at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 20, 25 and 30 minutes after rifampicin addition and immediately frozen in liquid nitrogen. RNA extraction was performed according to the TRIZOL method for *Escherichia coli* described in (Esquerré *et al.*, 2014) and the concentration of RNA was determined using a Nanodrop® spectrophotometer. For each condition only 12 times points have been extracted according to the following table:

CONDITION				
	Expo	G-Exhaustion	A-Consumption	C-Starvation
Replicate 1	T0, T0.5, T2, T5	T0, T1.5, T3, T7	T0, T0.5, T4, T7	T0, T1, T4, T11
Replicate 2	T0, T1, T3, T7	T0, T0.5, T4, T11	T0, T1.5, T3, T11	T0, T1.5, T2, T7
Replicate 3	T0, T1.5, T4, T11	T0, T1, T2, T5	T0, T1, T2, T5	T0, T0.5, T3, T5

Total RNA concentration and quality were measured using Nanodrop® spectrophotometer and Agilent Bioanalyzer (Santa Clara, California, USA).

Microarray procedures

The procedure was the same than the one used and described by Esquerre *et al.* (2014). Briefly it included a double-stranded complementary DNA synthesis followed by a labelling using the one color DNA labeling kit. The labeled cDNA were hybridized onto *E.coli* K-12 gene expression arrays (Nimblegen, Roche) according to the manufacturer's instruction. After being washed the arrays were scanned with a MS200 Microarray Scanner (Nimblegen, Roche). Array procedures as well as images processing with DEVA 1.2.1 software were performed by the GeT-Biopuces plateforme (<http://get.genotoul.fr>).

Transcriptome analysis

The transcriptome analysis was performed according to the method described in Esquerre *et al.* (2014) using the R computing environment (R core Team, 2012) and the limma (Smyth, 2005) and affy (Gautier *et al.*, 2004) packages of Bioconductor. Row probes intensities (three biological replicates for each condition of the study) were submitted to a RMA (Robust Multi-array Average)-based normalization approach (Irizarry *et al.*, 2003). For each condition an intra-replicate normalization was performed based on the quantile normalization technique (Bolstad *et al.*, 2003). A second normalization was performed across the 12 arrays analyzed for the transcriptome study using the median values of all their common invariant probesets intensities. Then, on each array, the intensity of a transcript was determined by a RMA-summarization procedure (Irizarry *et al.*, 2003). To obtain each transcript concentration value (in arbitrary unit/mg_{DW}), the intensities have been multiplied by the total RNA extraction yield (in $\mu\text{g}_{\text{RNA}}/\text{mg}_{\text{DW}}$) calculated for each condition: $45.2 \pm 8.1 \mu\text{g}_{\text{RNA}}/\text{mg}_{\text{DW}}$ (Expo), $33.6 \pm 2.7 \mu\text{g}_{\text{RNA}}/\text{mg}_{\text{DW}}$ (G-Exhaustion), $24,3 \pm 6 \mu\text{g}_{\text{RNA}}/\text{mg}_{\text{DW}}$ (A-Consumption) and $27 \pm 2.9 \mu\text{g}_{\text{RNA}}/\text{mg}_{\text{DW}}$ (C-Starvation). mRNA concentrations were compared by a modified T-test in conjunction with an empirical Bayes method. Adjusted p-value for multiple testing was determined by the “Benjamini and Hochberg” (BH) false discovery rate method (Benjamini and Hochberg, 1995). Significant differences in mRNA concentration were established for adjusted p-value inferior to 1%.

Stabilome analysis

The stabilome analysis enabled to determine for each condition the mRNA half-life according to the procedure described in Esquerre *et al.* (2014). For each condition 12 arrays were used to calculate the mRNA half-life: 3 reference T0 samples and 9 different time points after rifampicin addition. For each condition, the normalization between arrays was performed using the median values of all their common invariant probesets intensities. Then, on each array, the transcript intensity was calculated for each transcript by a RMA-summarization based on the polish median of the 32 targeting probes intensities. For each mRNA species the linear regression coefficient k of $\ln(\text{mRNA})$ versus time and its associated

coefficient of variation cv (standard error of slope/estimation of slope) were calculated. k corresponded to the degradation rate constant and was only considered as reliable if $cv \in [0 ; 40]$ in each condition. The half-life $t_{1/2}$ of each transcript was calculated according to its correlation to k since: $k = \frac{\ln(2)}{t_{1/2}}$. 725 $t_{1/2}$ have been calculated in the four conditions. The significant differences in $t_{1/2}$ were calculated using the probability value of interaction between time and condition in a global model of linear regression. Again, the p-value has been adjusted by the “BH” false discovery rate method (Benjamini and Hochberg, 1995). A p-value inferior to 10 % was used as criteria of significant difference between the $t_{1/2}$.

Determination of regulation coefficients

mRNA concentration results from changes of mRNA synthesis (transcription rate) and mRNA degradation since the mRNA dilution during growth can be neglected (Chen *et al.*, 2015; Dressaire *et al.*, 2013; Esquerré *et al.*, 2014; Redon *et al.*, 2005; Rustad *et al.*, 2013). The regulation coefficients ρ_D and ρ_T related to mRNA concentration variation between the different conditions have been determined as described in (Esquerré *et al.*, 2014). Briefly, the difference of mRNA concentrations between two steady states can be described as a function of the differences in the transcription rate V_t and the degradation rate k :

$$d[RNA] = \frac{1}{k} * dV_t - \frac{V_t}{k^2} * dk \quad (1)$$

which is equivalent to:

$$1 = \frac{d \ln V_t}{d \ln [RNA]} - \frac{d \ln k}{d \ln [RNA]} \quad (2)$$

The degradation coefficients ρ_D ($-\frac{d \ln k}{d \ln [RNA]}$) and the transcription coefficient ρ_T ($\frac{d \ln V_t}{d \ln [RNA]}$) can be calculated thanks to the equation (2). ρ_D represents the influence of mRNA decay on the RNA concentration and was calculated as the negative value of the slope of the double-logarithmic plot of k against the mRNA concentration determined before rifampicin treatment for each condition. ρ_T represents the importance of transcription rate on RNA concentration. Its value was deduced from ρ_D since their sum equal 1. Five regulatory classes have been

determined according to the p_D value: Class I: $p_T > 1$ and $p_D < 0$, Class II: $0.6 < p_T < 1$ and $0 < p_D < 0.4$, Class III p_T and $p_T \in [0.4; 0.6]$, Class IV: $0.6 < p_D < 1$ and $0 < p_T < 0.4$) and Class V: $p_D > 1$ and $p_T < 0$.

Clustering and enrichment methods

Clustering has been performed using the R software (R core Team, 2012) with the Ward classification method. Dendograms enabled to graphically determined the number of classes. A functional category enrichment was achieved in RNA subgroups using hypergeometric test of data based on the Biological Process of Gene Ontology annotation database (GO project: <http://www.geneontology.org/>). Enriched functional categories were considered only if they were associated to Fisher p-value < 5%.

Determination of exclusive regulons

Exclusive regulons associated to growth effect and to the three transcriptional regulators Crp, ppGpp and RpoS have been determined for this study. Growth rate, Crp, and ppGpp regulons were both divided into two regulons (up-regulated genes and down regulated genes) since these regulator either activate or inhibit transcription depending on their targets. Up and down regulon associated to the growth rate were obtained from Esquerre *et al.*, (2014): the 1440 genes whose expression always decreased with the growth rate constituted the growth rate initial down-regulon and the 45 genes whose expression increased in correlation to a decrease of growth rate constituted the initial growth rate up-regulon. Crp and RpoS regulons were determined thanks to the database RegulonDB (Gama-Castro *et al.*, 2011) and only genes associated to a “strong evidence” were considered. ppGpp regulon was determined from the supplementary data part of (Aberg *et al.*, 2009). Then exclusive regulon have been determined by removing from each regulon all the common regulations (Supplementary data S8).

Exclusive regulon for the post-transcriptional regulator CsrA was also constructed for this study. CsrA regulon was obtained from previous work in the lab (Esquerre *et al.*, (submitted)) and divided into up-regulon and down-regulon (Supplementary data S8).

ACKNOWLEDGMENTS

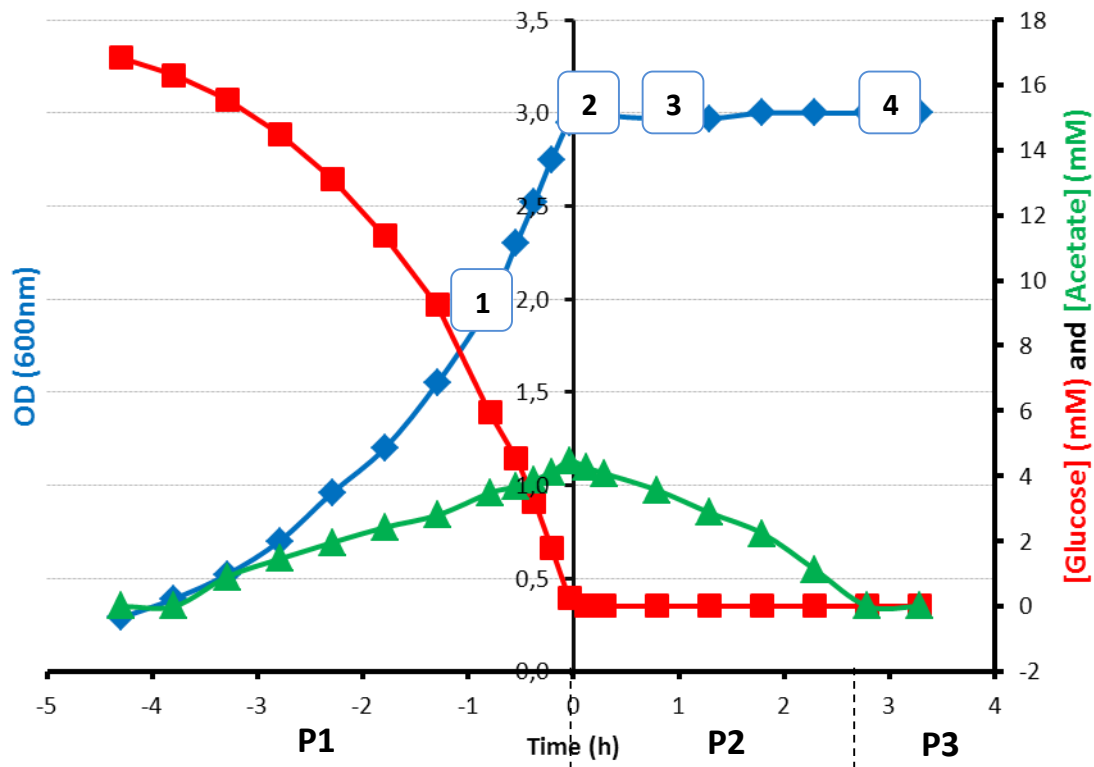
This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (Department 'Microbiology of the Food Chain') and the Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique) from which MM received a doctoral fellowship. GeT (Genomics & Transcriptomics Facilities, Toulouse, France, www.metatoul.fr) and its staff members (Lidwine Trouilh and Véronique Leberre) are gratefully acknowledged for micro-array experiments. The support of Sophie Mondeil for RNA extraction is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Aberg, A., Fernández-Vázquez, J., Cabrer-Panes, J.D., Sánchez, A., and Balsalobre, C. (2009). Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *191*, 3226–3236.
- Adamson, D.N., and Lim, H.N. (2013). Rapid and robust signaling in the CsrA cascade via RNA-protein interactions and feedback regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13120–13125.
- Agris, P.F., Vendeix, F.A.P., and Graham, W.D. (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J. Mol. Biol.* *366*, 1–13.
- Albertson, M.H., Nystrom, T., and Kjelleberg, S. (1990). Functional mRNA half-lives in the marine *Vibrio* sp. S14 during starvation and recovery. *J. Gen. Microbiol.* *136*, 2195–2199.
- Van Assche, E., Van Puyvelde, S., Vanderleyden, J., and Steenackers, H.P. (2015). RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria. *Front. Microbiol.* *6*, 141.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* *57*, 289–300.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.-H., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 9697–9702.
- Bernstein, J.A., Lin, P.-H., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. (2004). Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2758–2763.
- Berthoumieux, S., de Jong, H., Baptist, G., Pinel, C., Ranquet, C., Ropers, D., and Geiselmann, J. (2013). Shared control of gene expression in bacteria by transcription factors and global physiology of the cell. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 634.
- Bremer, H.C., and Dennis, P.P. (1996). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. In *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, (Washington: ASM Press), pp. 1553–1569.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., and Speed, T.P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *19*, 185–193.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S.A. (2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* *104*, 901–912.
- Chen, H., Shiroguchi, K., Ge, H., and Xie, X.S. (2015). Genome-wide study of mRNA degradation and transcript elongation in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* *11*, 808.
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 87–93.
- Dressaire, C., Picard, F., Redon, E., Loubière, P., Queinnec, I., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2013). Role of mRNA Stability during Bacterial Adaptation. *PLoS ONE* *8*, e59059.

- Durfee, T., Hansen, A.-M., Zhi, H., Blattner, F.R., and Jin, D.J. (2008). Transcription Profiling of the Stringent Response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 1084–1096.
- Enjalbert, B., Letisse, F., and Portais, J.-C. (2013). Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*. *Metabolites* *3*, 820–837.
- Enjalbert B, Coccagn-Bousquet M, Portais J-C, Letisse F. 2015. Acetate exposure determines the diauxic behavior of *Escherichia coli* during the glucoseacetate transition. *J Bacteriol* *197*,3173–3181.
- Esquerre, T., Turlan, C., Bouvier, M., Carpousis, A.J., Coccagn-Bousquet, M., Girbal, L. Genome-wide extent of the Csr system on mRNA expression and stability in *Escherichia coli*. **(Submitted)**.
- Esquerré, T., Laguerre, S., Turlan, C., Carpousis, A.J., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2014). Dual role of transcription and transcript stability in the regulation of gene expression in *Escherichia coli* cells cultured on glucose at different growth rates. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2460–2472.
- Gama-Castro, S., Salgado, H., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Muñiz-Rascado, L., Solano-Lira, H., Jimenez-Jacinto, V., Weiss, V., García-Sotelo, J.S., López-Fuentes, A., *et al.* (2011). RegulonDB version 7.0: transcriptional regulation of *Escherichia coli* K-12 integrated within genetic sensory response units (Gensor Units). *Nucleic Acids Res.* *39*, D98–D105.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M., and Irizarry, R.A. (2004). affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *20*, 307–315.
- Gerosa, L., Kochanowski, K., Heinemann, M., and Sauer, U. (2013). Dissecting specific and global transcriptional regulation of bacterial gene expression. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 658.
- Gunsalus, R.P., and Park, S.J. (1994). Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Res. Microbiol.* *145*, 437–450.
- Helm, M., and Alfonzo, J.D. (2014). Posttranscriptional RNA Modifications: playing metabolic games in a cell's chemical Legoland. *Chem. Biol.* *21*, 174–185.
- Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *21*, 887–893.
- Irizarry, R., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y., Antonellis, K., Scherf, U., and Arnold, T.E. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* *4*, 249–264.
- Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., Fulcher, C., Huerta, A.M., Kothari, A., Krummenacker, M., *et al.* (2013). EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res.* *41*, D605–D612.
- Kotte, O., Zaugg, J.B., and Heinemann, M. (2010). Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 355.
- Martinez-Antonio, A. (2011). *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. *Netw. Biol.* *1*, 21–23.
- Massé, E., Escorcía, F.E., and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *17*, 2374–2383.

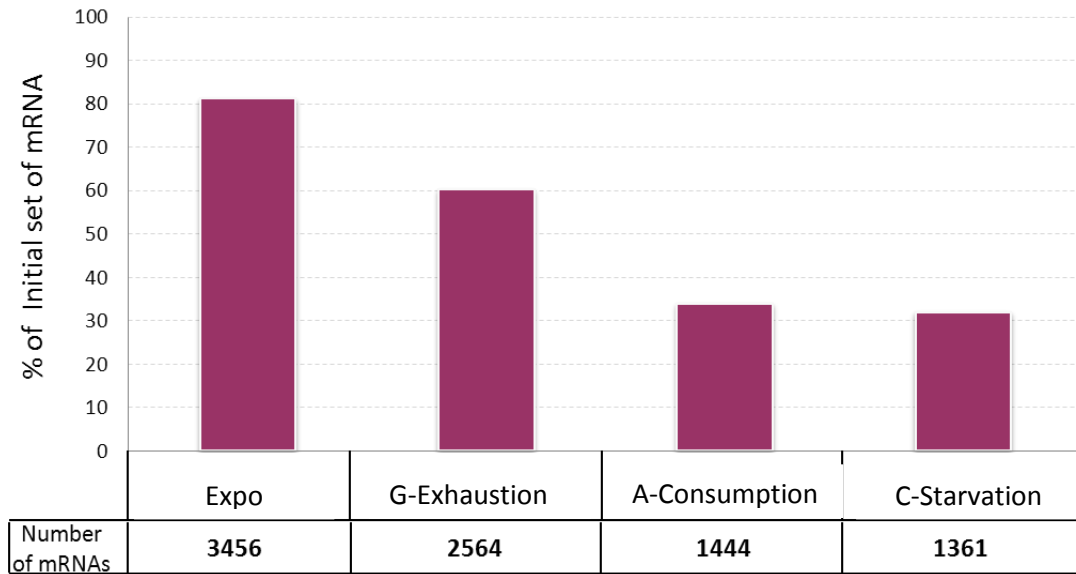
- Motorin, Y., and Helm, M. (2010). tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 4934–4944.
- Pernestig, A.-K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., and Melefors, Ö. (2003). The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System Is Needed for Efficient Switching between Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Sources. *J. Bacteriol.* *185*, 843–853.
- Perrenoud, A., and Sauer, U. (2005). Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *187*, 3171–3179.
- Rahman, M., Hasan, M.R., Oba, T., and Shimizu, K. (2006). Effect of *rpoS* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* during exponential growth phase and early stationary phase based on gene expressions, enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* *94*, 585–595.
- Redon, E., Loubière, P., and Cocaign-Bousquet, M. (2005). Role of mRNA stability during genome-wide adaptation of *Lactococcus lactis* to carbon starvation. *J. Biol. Chem.* *280*, 36380–36385.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* *175*, 4744–4755.
- Romeo, T., Vakulskas, C.A., and Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.* *15*, 313–324.
- Rustad, T.R., Minch, K.J., Brabant, W., Winkler, J.K., Reiss, D.J., Baliga, N.S., and Sherman, D.R. (2013). Global analysis of mRNA stability in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* *41*, 509–517.
- Smyth, G.K. (2005). limma: Linear Models for Microarray Data. In *Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor*, R. Gentleman, V.J. Carey, W. Huber, R.A. Irizarry, and S. Dudoit, eds. (Springer New York), pp. 397–420.
- Takayama, K., and Kjelleberg, S. (2000). The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ. Microbiol.* *2*, 355–365.
- Thorne, S.H., and Williams, H.D. (1997). Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: analysis of survival, stress resistance, and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase. *J. Bacteriol.* *179*, 6894–6901.
- Timmermans, J., and Melderer, L.V. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 2897–2908.
- Traxler, M.F., Chang, D.-E., and Conway, T. (2006). Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2374–2379.
- Traxler, M.F., Zacharia, V.M., Marquardt, S., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Stark, S.E., and Conway, T. (2011). Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the “feast to famine” gradient in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *79*, 830–845.
- Wolfe, A.J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *69*, 12–50.



- 1 Expo
- 2 G-Exhaustion
- 3 A-Consumption
- 4 C-Starvation

Figure 1: The glucose-acetate-starvation culture. Diamonds: OD at 600nm. Squares: Glucose (mM). Triangles: Acetate (mM). P1: first phase of the culture characterized by exponential growth on excess of glucose and acetate production. P2: second phase of the culture characterized by carbon consumption (acetate) associated to no growth (carbon limited phase). P3: Last phase of the culture characterized by carbon starvation.

A.



B.

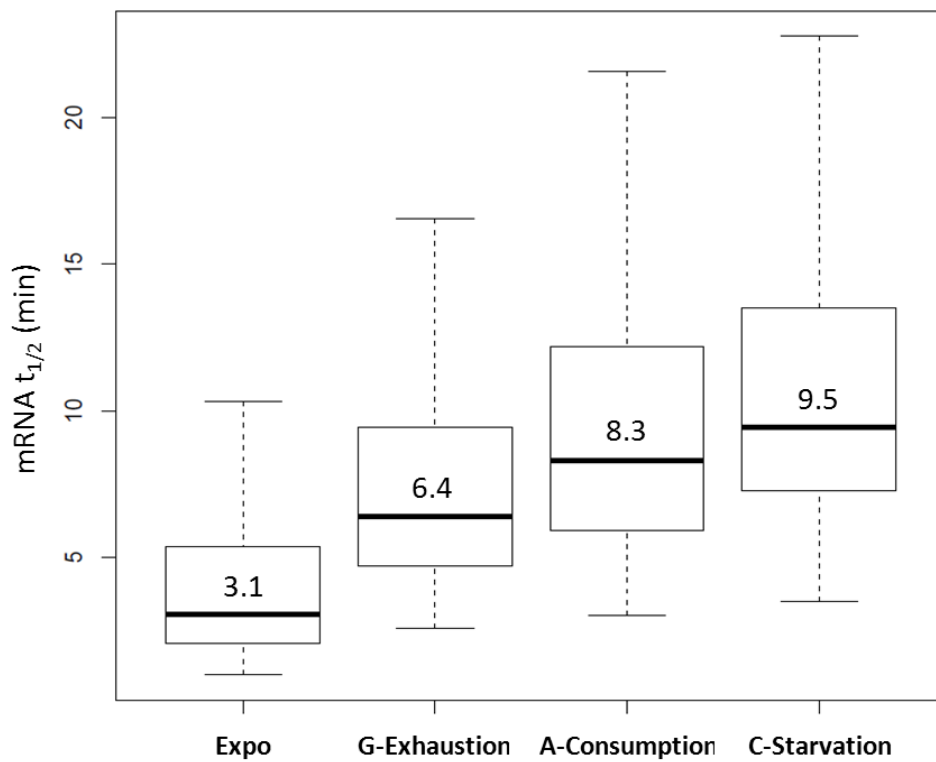
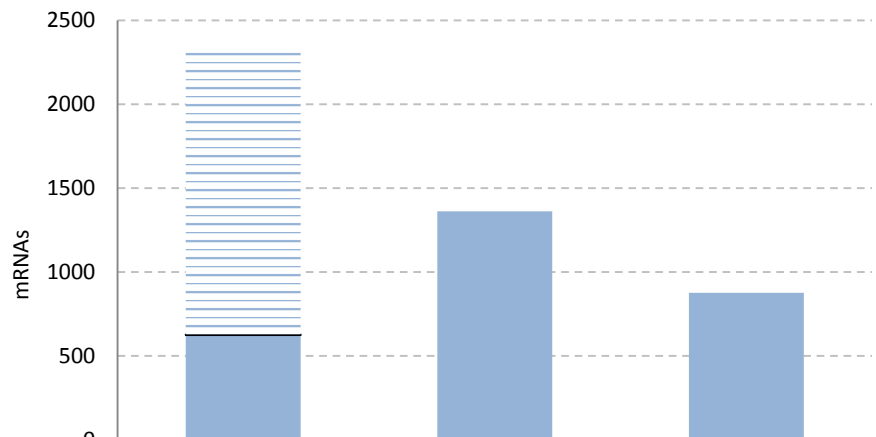


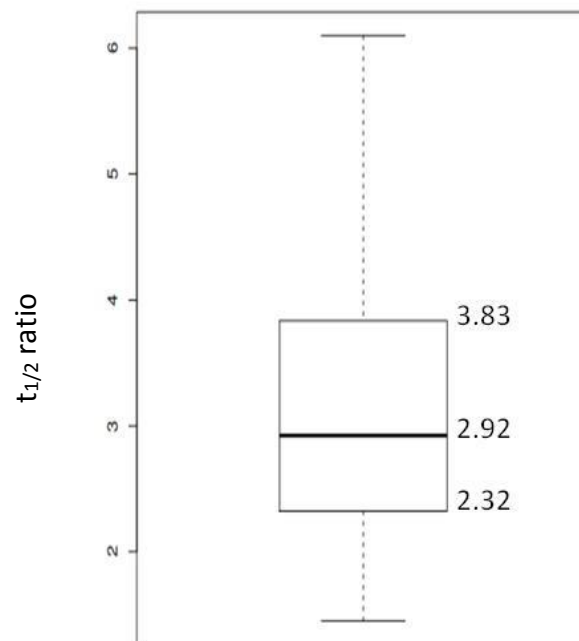
Figure 2: Analysis of global mRNA $t_{1/2}$. **A.** Proportion of reliable half-life at different culture stages. **B.** Boxplot of mRNA $t_{1/2}$ repartition for the 725 reliable mRNAs determined by the global model.

A.



	G-Exhaustion vs Expo	A-Consumption vs G-Exhaustion	C-Starvation vs A-Consumption
Stabilized mRNAs (increased t1/2)	1694	1	0
Destabilized mRNAs (decreased t1/2)	3	0	0
t1/2 Unsignificantly changed	624	1362	876

B.

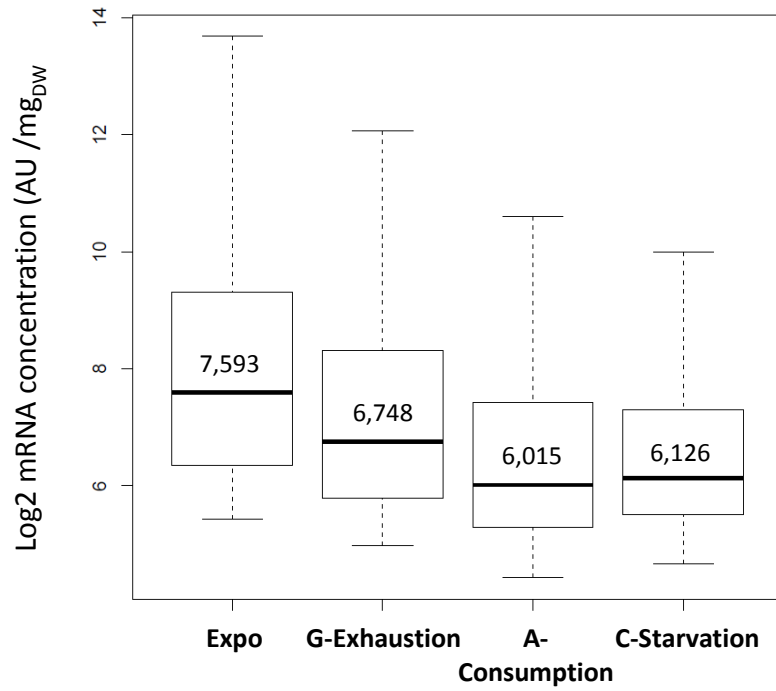


C.	GO.ID	Term	α	β	γ	Δ
1	GO:2000113	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	96	52	29.08	6.6e-07
2	GO:0010629	negative regulation of gene expression	74	42	22.42	1.6e-06
3	GO:0006526	arginine biosynthetic process	12	10	3.64	0.00022
4	GO:0006767	water-soluble vitamin metabolic process	68	31	20.6	0.00045
5	GO:0006281	DNA repair	76	37	23.03	0.00051
6	GO:0009432	SOS response	30	18	9.09	0.00068
7	GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	35	20	10.6	0.00082
8	GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	126	63	38.17	0.00098
9	GO:0000917	barrier septum assembly	16	11	4.85	0.00167
10	GO:1901698	response to nitrogen compound	10	8	3.03	0.00168
11	GO:0006573	valine metabolic process	17	11	5.15	0.00345
12	GO:0031323	regulation of cellular metabolic process	432	177	130.88	0.00613
13	GO:0051604	protein maturation	25	14	7.57	0.00642
14	GO:0006351	transcription, DNA-dependent	389	154	117.85	0.00861
15	GO:0065009	regulation of molecular function	36	18	10.91	0.00999
16	GO:0006575	cellular modified amino acid metabolic process	42	21	12.72	0.01196
17	GO:0051248	negative regulation of protein metabolic process	22	12	6.67	0.01494
18	GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	30	15	9.09	0.01812
19	GO:0006732	coenzyme metabolic process	126	52	38.17	0.01845
20	GO:0009089	lysine biosynthetic process via diaminopimelate	13	8	3.94	0.01917
21	GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	647	241	196.02	0.02066
22	GO:0010033	response to organic substance	23	12	6.97	0.02279
23	GO:0000160	phosphorelay signal transduction system	78	32	23.63	0.02704
24	GO:0043093	cytokinesis by binary fission	16	9	4.85	0.02706
25	GO:0043650	dicarboxylic acid biosynthetic process	37	17	11.21	0.03156
26	GO:0006650	glycerophospholipid metabolic process	17	9	5.15	0.04237
27	GO:0000154	rRNA modification	30	14	9.09	0.04262
28	GO:0048523	negative regulation of cellular process	120	64	36.36	0.04883
29	GO:0006782	protoporphyrinogen IX biosynthetic process	10	6	3.03	0.04930

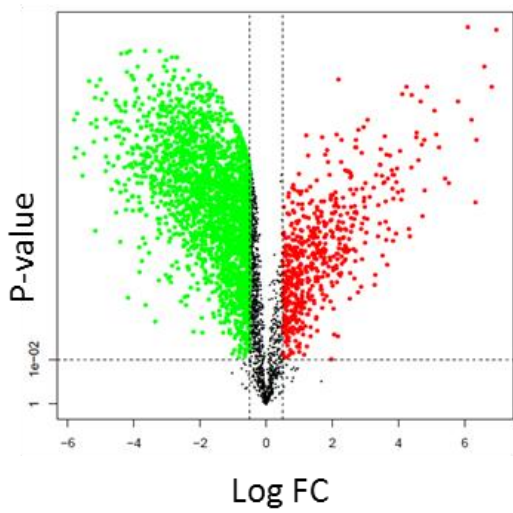
Cellular process regulation
 Gene expression regulation
 Stress response

Figure 3: Step by step comparison of mRNA stability. A. Number of mRNAs displaying a correct cv between two conditions. B. Distribution of $t_{1/2}$ ratio of stabilized mRNAs between G-Exhaustion and Expo. C. Functional enrichment analysis on the genes with a $t_{1/2}$ ratio $\in [1.5 ; 3.9]$. α : Annotated, β : Significant, γ : Expected, Δ : Fisher p-value

A.

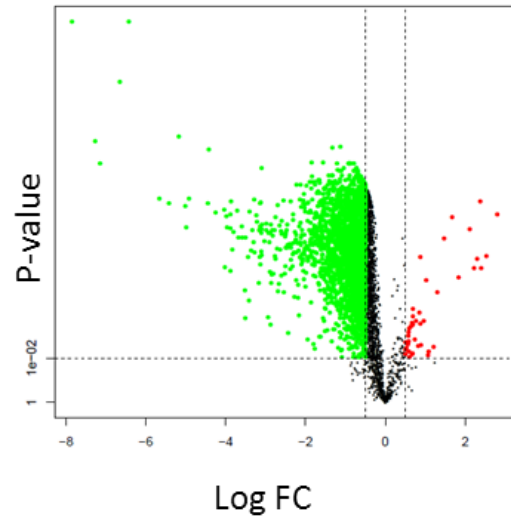


B.



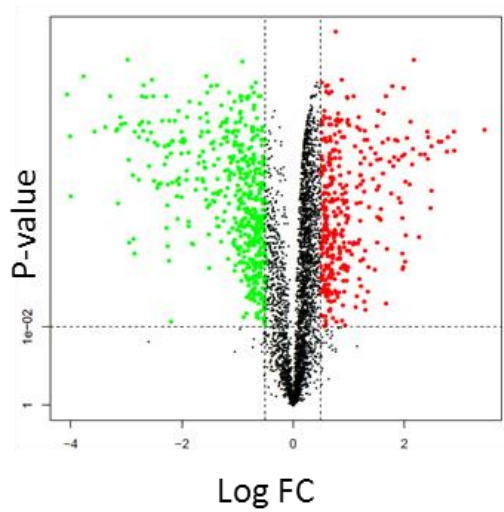
G-Exhaustion vs Expo

Up-regulated genes: **581**
Down-regulated genes: **2426**



A-Consumption vs G-Exhaustion

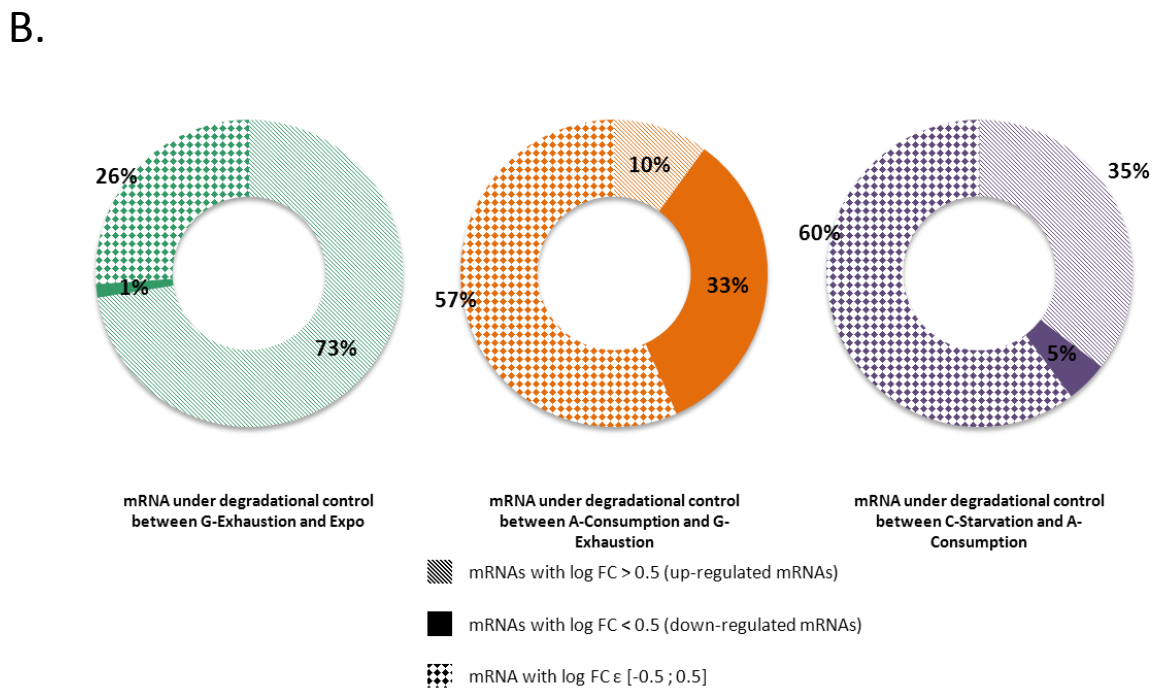
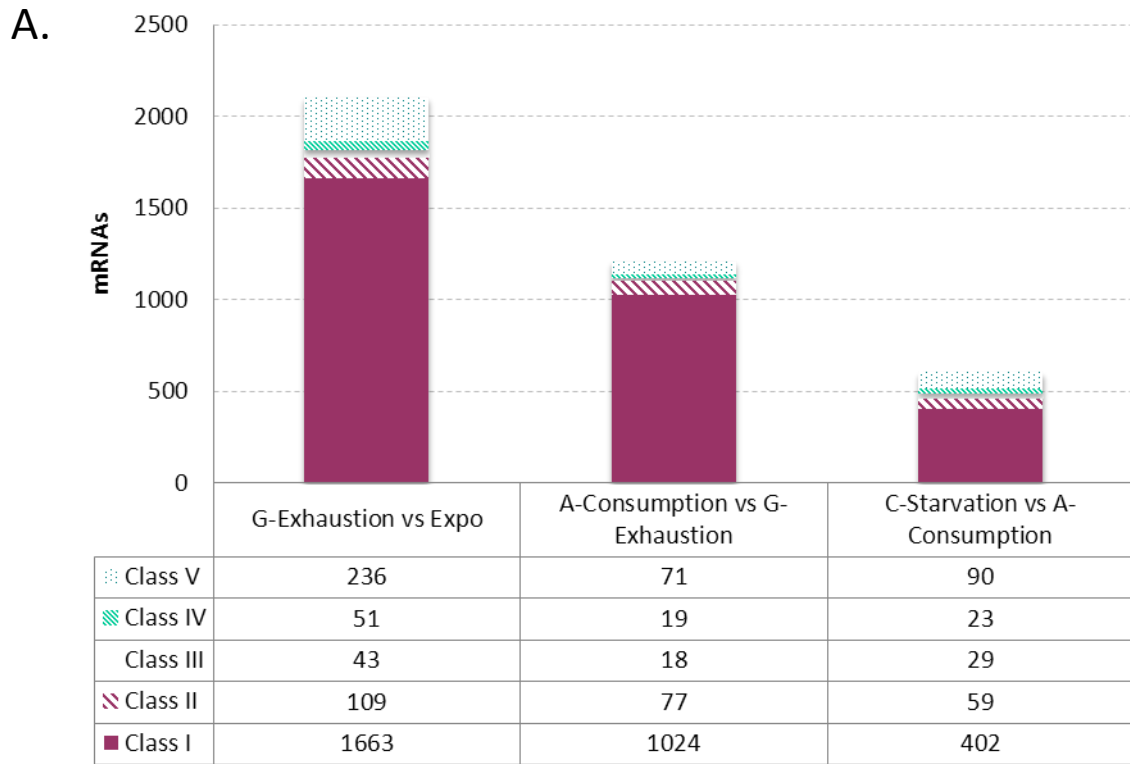
Up-regulated genes: **41**
Down-regulated genes: **2427**



C-Starvation vs A-Consumption

Up-regulated genes: **371**
Down-regulated genes: **501**

Figure 4: Transcriptome analysis. **A.** Repartition of log₂ mRNA concentration at different culture stages. **B.** Volcanoplots of the Log₂ fold change (LogFC) of mRNA levels between two culture conditions. Fold change significance is associated to a p-value ≤ 0.01 (above the horizontal dashed line) and a logFC ≤ -0.5 or ≥ 0.5 (outside the vertical dashed lines). Up-regulated concentrations are represented in red and down-regulated concentration in green.



C.	GO.ID	Term	α	β	γ	Δ
1	GO:0019285	glycine betaine biosynthetic process from choline	4	4	0.26	1.8e-05
2	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	377	43	24.76	0.00013
3	GO:0051276	chromosome organization	12	5	0.79	0.00063
4	GO:0001123	transcription initiation from bacterial-type RNA polymerase promoter	4	3	0.26	0.00106
5	GO:0015689	molybdate ion transport	4	3	0.26	0.00106
6	GO:0019262	N-acetylneuraminate catabolic process	5	3	0.33	0.00253
7	GO:0042840	D-glucuronate catabolic process	6	3	0.39	0.00482
8	GO:2000113	negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	96	15	6.31	0.00540
9	GO:0006402	mRNA catabolic process	13	4	0.85	0.00808
10	GO:0010124	phenylacetate catabolic process	14	4	0.92	0.01074
11	GO:0005977	glycogen metabolic process	8	3	0.53	0.01223
12	GO:0042851	L-alanine metabolic process	3	2	0.2	0.01233
13	GO:0009114	hypoxanthine catabolic process	3	2	0.2	0.01233
14	GO:0035966	response to topologically incorrect protein	3	2	0.2	0.01233
15	GO:1901072	glucosamine-containing compound catabolic process	3	2	0.2	0.01233
16	GO:0019594	mannitol metabolic process	4	2	0.26	0.02359
17	GO:0019407	hexitol catabolic process	4	2	0.26	0.02359
18	GO:0031365	N-terminal protein amino acid modification	4	2	0.26	0.02359
19	GO:0032329	serine transport	4	2	0.26	0.02359
20	GO:0009086	methionine biosynthetic process	18	4	1.18	0.02669
21	GO:0051607	defense response to virus	11	3	0.72	0.03111
22	GO:0042026	protein refolding	5	2	0.33	0.03762
23	GO:0030091	protein repair	5	2	0.33	0.03762
24	GO:2000104	negative regulation of DNA-dependent DNA replication	5	2	0.33	0.03762
25	GO:0006044	N-acetylglucosamine metabolic process	5	2	0.33	0.03762
26	GO:0009166	nucleotide catabolic process	12	3	0.79	0.03952
27	GO:0006835	dicarboxylic acid transport	12	3	0.79	0.03952

Cellular process regulation
 Gene expression regulation

Figure 5: Analysis of mRNA concentration control coefficients. **A.** Repartition of the control class associated to degradational and transcriptional control during gene expression reorganization between two culture stages. **B.** Proportion of each mRNA concentration modification among the mRNA under degradational control. **C.** Functional enrichment analysis among the up-regulated genes under degradational control between G-Exhaustion and Expo. α : Annotated, β : Significant, γ : Expected, Δ : Fisher p-value.

A.

	Size of the exclusive regulon among the 4254 genes (number of genes)	Size of the exclusive regulon among the 725 genes (number of genes)
μ_up	29	1
μ_down	1157	182
Crp_up	118	22
Crp_down	29	9
ppGpp_up	204	26
ppGpp_down	147	25
RpoS_up	59	11
CsrA_up	397	55
CsrA_down	51	5

B.

		G-Exhaustion vs Expo	A-Consumption vs G-Exhaustion	C-Starvation vs A-Consumption
Transcriptional	Up-regulated mRNAs	67	19	84
	Down-regulated mRNAs	437	536	219
Degradational	Up-regulated mRNAs	81	1	34
	Down-regulated mRNAs	3	18	0

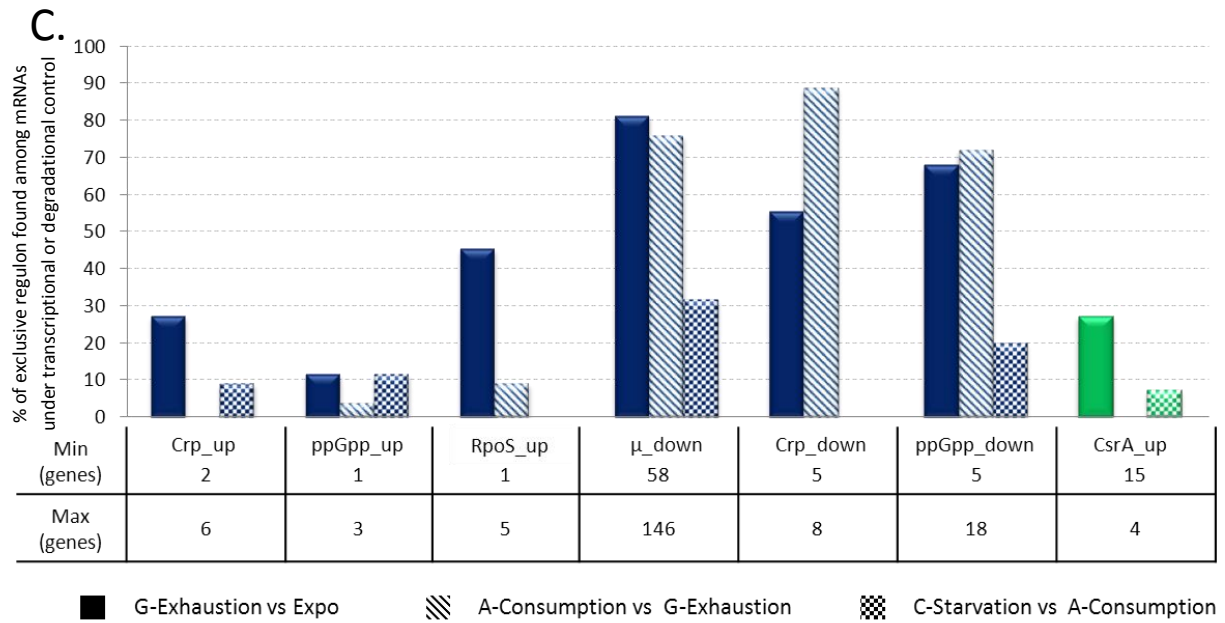
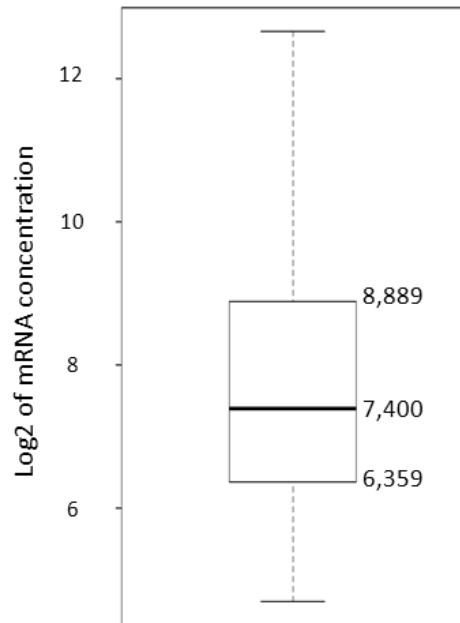


Figure 6: Research of exclusive regulon of the growth rate, the transcriptional regulators Crp and ppGpp, RpoS and the post-transcriptional regulator CsrA in mRNA sets under transcriptional or degradational control among the 725 analyzed genes. A. Size of each exclusive regulon among either the 4254 genes or the 725 analyzed genes. **B.** Number of up- and down-regulated mRNAs under transcriptional or degradational control among the 725 analyzed genes. **C.** Percentage of exclusive regulon in genes under transcriptional or degradational control. The table encompasses the number of mRNAs associated to the maximum and the minimum percentage of each regulon. Blue: transcriptional control. Green: degradational control.

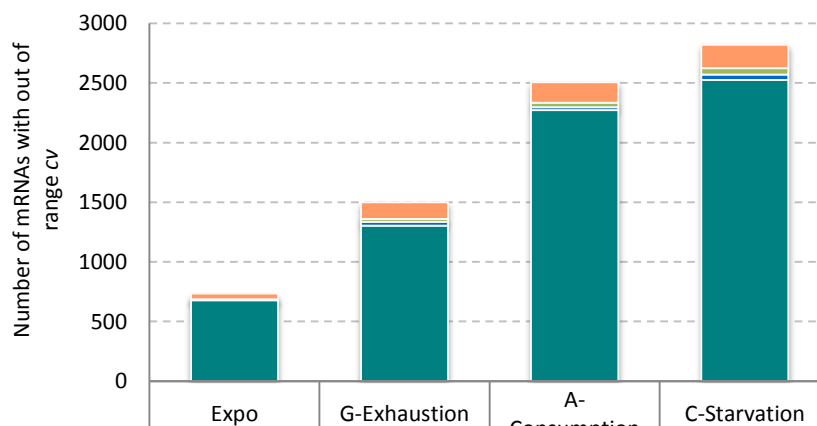
μ_{up} = Exclusive up-regulon of the growth rate; μ_{down} = Exclusive down-regulon of the growth rate; Crp_{up}= Exclusive up-regulon of Crp; Crp_{down}= Exclusive down-regulon of Crp; ppGpp_{up}= Exclusive up-regulon of ppGpp; ppGpp_{down}= Exclusive down-regulon of ppGpp; RpoS_{up}= Exclusive up-regulon of RpoS; CsrA_{up}= Exclusive up-regulon of CsrA; CsrA_{down}= Exclusive down-regulon of CsrA;.

Supplementary data 1: Correlation between unreliable $t_{1/2}$ calculation and low mRNA concentration.

A. Distribution of mRNA concentration of all the mRNAs in each condition with a reliable $t_{1/2}$.

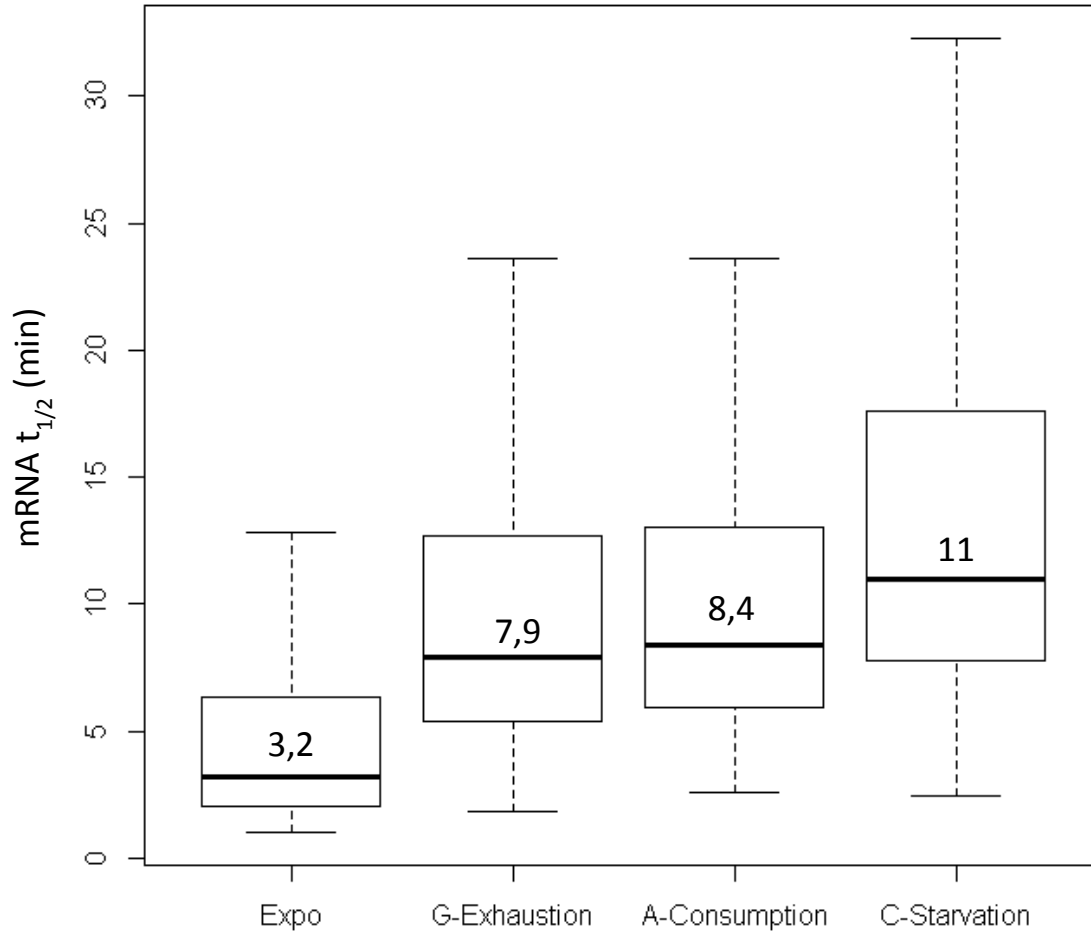


B. For each condition: classification according to their concentration of mRNA associated to an unreliable $t_{1/2}$. The groups have been defined according to the quartiles and median of the A distribution. Concentrations inferior to the first quartile of the distribution were considered too low to enable a reliable calculation of $t_{1/2}$ with our method.



	Expo	G-Exhaustion	A-Consumption	C-Starvation
3rd quartile<[mRNA]	48	142	171	197
median<[mRNA]<3rd quartile	4	24	37	53
1st quartile<[mRNA]<median	4	30	24	45
[mRNA]<1st quartile	678	1305	2274	2525

Supplementary data 2: For each condition, distribution of reliable mRNA $t_{1/2}$



Supplementary data 3: Half-life evolution of the three mRNAs destabilized between G-Exhaustion and Expo

	Expo		G-Exhaustion		A-Consumption	
	$t_{1/2}$	<i>CV</i>	$t_{1/2}$	<i>CV</i>	$t_{1/2}$	<i>CV</i>
<i>rpiB</i>	6,42	13,82	3,67	32,75	12,02	136,2
<i>yfeW</i>	6,15	7,92	3,47	32,85	10,86	36,13
<i>yhaO</i>	12,26	11,75	5,17	31,46	22,86	45,28


Supplementary data 4: GO-Term enrichment analysis of stabilized mRNAs between G-Exhaustion and Expo with a $t_{1/2}$ ratio > 3.83.

Only the function associated to a p-value > 5% are displayed.

	GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	Fis
1	GO:0002098	tRNA wobble uridine modification	10	7	1.08	1.4e-05
2	GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	25	11	2.69	2.2e-05
3	GO:0034613	cellular protein localization	19	8	2.05	0.00044
4	GO:0043952	protein transport by the Sec complex	6	4	0.65	0.00167
5	GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	44	12	4.74	0.00174
6	GO:0070475	rRNA base methylation	19	7	2.05	0.00253
7	GO:0006399	tRNA metabolic process	89	31	9.59	0.00571
8	GO:0030488	tRNA methylation	12	5	1.29	0.00589
9	GO:0072511	divalent inorganic cation transport	12	5	1.29	0.00589
10	GO:0006270	DNA replication initiation	8	4	0.86	0.00652
11	GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	8	4	0.86	0.00652
12	GO:0009244	lipopolysaccharide core region biosynthetic process	23	7	2.48	0.00843
13	GO:0046474	glycerophospholipid biosynthetic process	13	5	1.4	0.00873
14	GO:0015889	cobalamin transport	5	3	0.54	0.01051
15	GO:1902208	regulation of bacterial-type flagellum assembly	5	3	0.54	0.01051
16	GO:0016044	cellular membrane organization	18	7	1.94	0.01053
17	GO:0008360	regulation of cell shape	48	11	5.17	0.01113
18	GO:0044038	cell wall macromolecule biosynthetic process	48	11	5.17	0.01113
19	GO:0071555	cell wall organization	19	6	2.05	0.01202
20	GO:0006414	translational elongation	14	5	1.51	0.01241
21	GO:0034030	ribonucleoside bisphosphate biosynthetic process	10	4	1.08	0.01641
22	GO:0034033	purine nucleoside bisphosphate biosynthetic process	10	4	1.08	0.01641
23	GO:0009108	coenzyme biosynthetic process	99	19	10.67	0.01658
24	GO:0032259	methylation	63	20	6.79	0.01832
25	GO:0034775	glutathione transmembrane transport	6	3	0.65	0.01935
26	GO:0001887	selenium compound metabolic process	6	3	0.65	0.01935
27	GO:0009408	response to heat	39	9	4.2	0.01996

Chapitre 3

28	GO:0072330	monocarboxylic acid biosynthetic process	33	8	3.56	0.02077
29	GO:0051301	cell division	72	13	7.76	0.02111
30	GO:0046417	chorismate metabolic process	16	5	1.72	0.02260
31	GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	11	4	1.19	0.02364
32	GO:0009073	aromatic amino acid family biosynthetic process	22	6	2.37	0.02504
33	GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	126	23	13.58	0.02655
34	GO:0006265	DNA topological change	7	3	0.75	0.03119
35	GO:0008156	negative regulation of DNA replication	7	3	0.75	0.03119
36	GO:0007059	chromosome segregation	12	4	1.29	0.03252
37	GO:0006835	dicarboxylic acid transport	12	4	1.29	0.03252
38	GO:0006935	chemotaxis	25	6	2.69	0.04515
39	GO:0009306	protein secretion	25	6	2.69	0.04515
40	GO:1901070	guanosine-containing compound biosynthetic process	8	3	0.86	0.04600

 tRNA post-transcriptional modifications

Supplementary data 5: GO-Term enrichment analysis on up-regulated genes

Only the function associated to a p-value > 5% are displayed.

A. Enrichment on up-regulated genes between G-Exhaustion and Expo.

	GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	Fis
1	GO:0046174	polyol catabolic process	15	11	1.92	1.2e-07
2	GO:0006635	fatty acid beta-oxidation	7	7	0.9	5.5e-07
3	GO:0000105	histidine biosynthetic process	10	8	1.28	2.5e-06
4	GO:0008643	carbohydrate transport	122	43	15.66	3.1e-06
5	GO:0019323	pentose catabolic process	13	9	1.67	3.9e-06
6	GO:0042355	L-fucose catabolic process	6	6	0.77	4.3e-06
7	GO:0006071	glycerol metabolic process	17	10	2.18	9.2e-06
8	GO:0015757	galactose transport	7	6	0.9	2.7e-05
9	GO:0019544	arginine catabolic process to glutamate	5	5	0.64	3.4e-05
10	GO:0019545	arginine catabolic process to succinate	5	5	0.64	3.4e-05
11	GO:0015750	pentose transport	9	6	1.15	0.00026
12	GO:0055114	oxidation-reduction process	490	102	62.88	0.00042
13	GO:0015791	polyol transport	7	5	0.9	0.00057
14	GO:0006113	fermentation	7	5	0.9	0.00057
15	GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	25	10	3.21	0.00059
16	GO:0072329	monocarboxylic acid catabolic process	80	28	10.27	0.00096
17	GO:0015794	glycerol-3-phosphate transport	5	4	0.64	0.00120
18	GO:0019579	aldaric acid catabolic process	5	4	0.64	0.00120
19	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	377	67	48.38	0.00264
20	GO:0006979	response to oxidative stress	70	20	8.98	0.00505
21	GO:0009628	response to abiotic stimulus	114	26	14.63	0.00713
22	GO:0044011	single-species biofilm formation on inanimate substrate	11	5	1.41	0.00810
23	GO:0006059	hexitol metabolic process	12	5	1.54	0.01244
24	GO:0042402	cellular biogenic amine catabolic process	30	9	3.85	0.01632
25	GO:0009448	gamma-aminobutyric acid metabolic process	5	3	0.64	0.01719

Chapitre 3

26	GO:0005978	glycogen biosynthetic process	5	3	0.64	0.01719
27	GO:0051454	intracellular pH elevation	5	3	0.64	0.01719
28	GO:0009074	aromatic amino acid family catabolic process	5	3	0.64	0.01719
29	GO:0009438	methylglyoxal metabolic process	9	4	1.15	0.01983
30	GO:0006098	pentose-phosphate shunt	14	5	1.8	0.02529
31	GO:0034614	cellular response to reactive oxygen species	14	5	1.8	0.02529
32	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	14	5	1.8	0.02529
33	GO:0042840	D-glucuronate catabolic process	6	3	0.77	0.03114
34	GO:0006097	glyoxylate cycle	6	3	0.77	0.03114
35	GO:0043086	negative regulation of catalytic activity	11	4	1.41	0.04215
36	GO:0006004	fucose metabolic process	9	8	1.15	0.04404
37	GO:0005991	trehalose metabolic process	7	3	0.9	0.04939
38	GO:0071468	cellular response to acidity	7	3	0.9	0.04939
39	GO:1900190	regulation of single-species biofilm formation	12	4	1.54	0.05701

Metabolism or transport of alternative carbon sources
 Response to stress

B. Enrichment on up-regulated genes between C-Starvation and A-Consumption.

	GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	Fis
1	GO:0006412	translation	133	63	12.72	< 1e-30
2	GO:0071973	bacterial-type flagellar cell motility	43	18	4.11	2.2e-08
3	GO:0009065	glutamine family amino acid catabolic process	11	8	1.05	8.2e-07
4	GO:0000103	sulfate assimilation	8	6	0.77	1.7e-05
5	GO:0043213	bacteriocin transport	8	6	0.77	1.7e-05
6	GO:0070814	hydrogen sulfide biosynthetic process	6	5	0.57	4.3e-05
7	GO:0009238	enterobactin metabolic process	9	6	0.86	4.8e-05
8	GO:0019344	cysteine biosynthetic process	9	5	0.86	0.00071
9	GO:0015031	protein transport	85	19	8.13	0.00104
10	GO:0009268	response to pH	25	8	2.39	0.00242
11	GO:0042274	ribosomal small subunit biogenesis	8	4	0.77	0.00421

Chapitre 3

12	GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	48	12	4.59	0.00489
13	GO:0009409	response to cold	13	5	1.24	0.00523
14	GO:0051454	intracellular pH elevation	5	3	0.48	0.00749
15	GO:0006354	DNA-dependent transcription, elongation	5	3	0.48	0.00749
16	GO:0019629	propionate catabolic process, 2-methylcitrate cycle	5	3	0.48	0.00749
17	GO:0006970	response to osmotic stress	32	8	3.06	0.00869
18	GO:0044781	bacterial-type flagellum organization	20	6	1.91	0.00888
19	GO:0001101	response to acid	10	4	0.96	0.01082
20	GO:0048878	chemical homeostasis	61	15	5.83	0.01167
21	GO:0072593	reactive oxygen species metabolic process	6	3	0.57	0.01392
22	GO:0042254	ribosome biogenesis	53	13	5.07	0.01582
23	GO:0009082	branched-chain amino acid biosynthetic process	23	6	2.2	0.01811
24	GO:0008272	sulfate transport	7	3	0.67	0.02265
25	GO:0006935	chemotaxis	25	6	2.39	0.02702
26	GO:0006996	organelle organization	44	11	4.21	0.02706
27	GO:0043101	purine-containing compound salvage	13	4	1.24	0.02926
28	GO:0042710	biofilm formation	79	13	7.56	0.03474
29	GO:0042128	nitrate assimilation	20	5	1.91	0.03609
30	GO:0034614	cellular response to reactive oxygen species	14	4	1.34	0.03796
31	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	14	4	1.34	0.03796
32	GO:0046129	purine ribonucleoside biosynthetic process	39	8	3.73	0.04381
33	GO:0006605	protein targeting	9	3	0.86	0.04707
34	GO:0006885	regulation of pH	9	5	0.86	0.04732



Translation



Response to stress and persistence preparation

Supplementary data 6: Genes under degradational control and down-regulated between A-Consumption and G-Exhaustion

GeneSym	GeneName
zntA	zinc, cadmium and lead efflux system
yrbG	inner membrane protein YrbG
kch	K ⁺ channel Kch monomer
araJ	putative transport protein
ydfB	Qin prophage; small protein
yadE	predicted polysaccharide deacetylase lipoprotein
nrfF	activator of formate-dependent nitrite reductase complex
yeiL	YeiL DNA-binding transcriptional activator
yafO	ribosome-dependent mRNA interferase, toxin of the YafO-YafN toxin-antitoxin system
yafP	predicted acyltransferase with acyl-CoA N-acyltransferase domain
allS	AllS transcriptional activator
ybcM	DLP12 prophage; predicted DNA-binding transcriptional regulator
yliI	aldose sugar dehydrogenase
pinR	Rac prophage; predicted site-specific recombinase
intQ	Qin prophage; predicted defective integrase
yeaQ	conserved inner membrane protein
yegI	conserved protein
csiD	predicted protein
ygdI	putative lipoprotein
hyfG	hydrogenase 4, large subunit

Supplementary data 7: GO-Term enrichment analysis on genes under degradational control
 Only the function associated to a p-value > 5% are displayed.

A. Enrichment on mRNAs under degradational control between A-Consumption and G-Exhaustion.

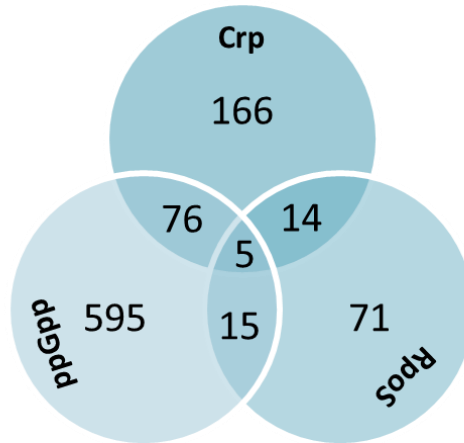
	GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	Fis
1	GO:0071468	cellular response to acidity	7	2	0.14	0.0073
2	GO:0006974	response to DNA damage stimulus	98	6	1.9	0.0109
3	GO:0000910	cytokinesis	28	3	0.54	0.0161
4	GO:0009432	SOS response	30	3	0.58	0.0194
5	GO:0006526	arginine biosynthetic process	12	2	0.23	0.0215
6	GO:0017148	negative regulation of translation	18	2	0.35	0.0463

B. Enrichment on mRNAs under degradational control between C-Starvation and A-Consumption.

	GO.ID	Term	Annotated	Significant	Expected	Fis
1	GO:0018104	peptidoglycan-protein cross-linking	3	2	0.07	0.0017
2	GO:0051596	methylglyoxal catabolic process	7	2	0.17	0.0110
3	GO:0006829	zinc ion transport	7	2	0.17	0.0110
4	GO:0043164	Gram-negative-bacterium-type cell wall biogenesis	8	2	0.19	0.0144
5	GO:0006284	base-excision repair	10	2	0.24	0.0224
6	GO:0009062	fatty acid catabolic process	13	2	0.31	0.0371

Supplementary data 8: Exclusive regulons of transcriptional regulators (TR) Crp, ppGpp and RpoS and post-transcriptional regulator CsrA.

A. Venn Diagram of the shared regulations across the three TR



B. Size of the exclusive regulons

Regulons of transcriptional effectors (transcriptional regulators TR and growth rate μ)

		Number of genes
ppGpp up-regulon	Complete regulon	358
	Regulon without shared regulation by other TR	294
	Exclusive regulon (without growth effect)	204

		Number of genes
ppGpp down-regulon	Complete regulon	323
	Regulon without shared regulation by other TR	291
	Exclusive regulon (without growth effect)	147

		Number of genes
Crp up-regulon	Complete regulon	229
	Regulon without shared regulation by other TR	141
	Exclusive regulon (without growth effect)	118

		Number of genes
Crp down-regulon	Complete regulon	67
	Regulon without shared regulation by other TR	45
	Exclusive regulon (without growth effect)	29

		Number of genes
RpoS up-regulon	Complete regulon	107
	Regulon without shared regulation by other TR	71
	Exclusive regulon (without growth effect)	59

		Number of genes
μ up-regulon	Complete regulon	1440
	Exclusive regulon (without each TR shared regulation)	29

		Number of genes
μ down-regulon	Complete regulon	45
	Exclusive regulon (without each TR shared regulation)	1157

Regulons of the post-transcriptional regulator CsrA

		Number of genes
CsrA up-regulon	Exclusive regulon	397

		Number of genes
CsrA down-regulon	Exclusive regulon	51

Supplementary data 9: Genes under degradational control and belonging to CsrA up-regulon

A. Genes under degradational control between G-Exhaustion and Expo and belonging to CsrA up-regulon

	Genes Name
yabl	conserved inner membrane protein
yagE	CP4-6 prophage; probable 2-keto-3-deoxygluconate aldolase
yaiE	conserved protein
ybjP	predicted lipoprotein
pepT	peptidase T
feaB	FeaB
ydCL	predicted lipoprotein
sbmC	DNA gyrase inhibitor
yhdH	acrylyl-CoA reductase
mtlD	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase
qor	Qor
alsK	EG11956-MONOMER
msrA	methionine sulfoxide reductase A
yjgA	putative alpha-helix protein
rraB	ribonuclease E inhibitor protein B

B. Genes under degradational control between C-Starvation and A-Consumption and belonging to CsrA up-regulon

	Genes Name
fadE	Acylcoadehydrog-monomer
ydCL	predicted lipoprotein
yfjP	CP4-57 prophage; predicted GTP-binding protein
ascB	6-phospho-β-glucosidase; cryptic

CHAPITRE 4

Rôle du système CSR dans la régulation de l'expression génique lors de la phase de croissance exponentielle sur glucose

Les travaux précédents ont mis en évidence le rôle non négligeable des régulations de la stabilité des ARNm dans la régulation des pools d'ARNm et de l'expression génique lors de l'adaptation d'*E. coli* aux changements en ressources carbonées. L'importance du système CSR dans la régulation de la croissance sur glucose témoigne du rôle potentiel de telles régulations dans la régulation et l'optimisation de la croissance exponentielle en présence de glucose. Le premier chapitre a notamment montré l'impact de CSR sur les pools d'ARNm des gènes glycolytiques sans toutefois permettre de déterminer si cet effet résulte de régulations directes de la stabilité de ces ARNm ou de régulations indirectes de leur transcription. Alors que le chapitre 1 se focalise sur le métabolisme carboné central (MCC), CSR est défini comme un régulateur global et est donc susceptible de modifier un grand nombre de pools d'ARNm durant la croissance sur glucose.

Il est maintenant nécessaire de déterminer l'impact général du système CSR sur l'expression génique lors de la croissance sur glucose. Ce chapitre décrit la démarche de travaux en cours de production concernant l'impact de CSR dans ces conditions. Dans ces travaux, nous chercherons à déterminer quels sont les gènes dont la stabilité est directement régulée par CSR et dans quelle mesure cela contribue à la régulation du pool de leur ARNm lors de la croissance. D'autre part, nous rechercherons les gènes sous contrôle indirect de CSR, autrement dit, les gènes dont les pools d'ARNm sont modifiés suite à une modification du système CSR mais ceci indépendamment d'une régulation de leur stabilité.

Pour répondre à ces questions, nous produirons le transcriptome et le stabilome des souches *csrA51* et Δ *csrBC* (chapitres 1 & 2) lors d'une croissance exponentielle sur M9-Glucose. Les données similaires obtenues pour la souche sauvage WT MG1655 pour le point Expo dans le chapitre 3, seront également utilisées dans ce chapitre. Les souches *csrA51* et *csrBC* sont deux souches antagonistes en termes de phénotype CSR. La souche *csrA51* correspond à une délétion des 10 derniers acides aminés de la protéine CsrA et donc à une diminution de l'activité de la protéine et de fait de l'effet du système CSR. Au contraire, la souche Δ *csrBC* correspond à la délétion des deux ARNnc CsrB et CsrC séquestrant la protéine CsrA, entraînant l'absence de régulation de la protéine CsrA et donc une sur-activation du

système CSR. L'utilisation de ces deux souches permettra d'améliorer la précision des analyses et de renforcer les conclusions concernant les régulations directes et indirectes par CSR.

Au moment de l'écriture de ce manuscrit, seules les cultures et les échantillonnages nécessaires à cette étude ont été produits. La production des données et leur analyse seront effectuées entre les mois de Septembre et Novembre. Pour chaque souche (*csrA51* et Δ *csrBC*), 3 cultures en bioréacteurs ont été effectuées dans 1L de milieu M9-Glucose. Un premier échantillon d'ARN à T0 a été effectué à DO=2 avant ajout de la rifampicine. Après ajout de rifampicine (DO=2), les prélèvements d'ARN ont été effectués aux temps : 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 20, 25 et 30 minutes. Les stabilomes et transcriptomes seront obtenus après extraction des ARNm et leur analyse sur microarrays. Pour chaque souche, les stabilomes seront obtenus en utilisant 4 points de prélèvement par réplica, comme présenté dans le chapitre 3 et les transcriptomes seront obtenus à partir des T0.

1. Comparaison des transcriptomes des souches *csrA51*, Δ *csrBC* et WT.

Les transcriptomes des souches *csrA51* et Δ *csrBC* seront obtenus à partir des données des T0 de chaque réplica selon la même procédure que celle décrite dans la section « materials and methods » (transcriptome analysis) du chapitre 3.

Une fois ces deux transcriptomes obtenus, les transcriptomes des souches WT, *csrA51* et Δ *csrBC* seront comparés deux à deux : *csrA51* vs WT, Δ *csrBC* vs WT et Δ *csrBC* vs *csrA51*. Les gènes sur-exprimés entre deux conditions seront définis par une p-value < 1% et à un logFC > 0.5 et les gènes sous-exprimés par une p-value < 1% et un logFC < -0.5. En recoupant les résultats des trois comparaisons nous serons capables d'extraire les gènes dont la concentration en ARNm est sous contrôle de CSR, et si CSR a un effet positif ou négatif sur ces pools. En effet, les gènes dont les pools d'ARNm seront contrôlés négativement par CSR correspondront à l'intersection des trois catégories : gènes sous-exprimés Δ *csrBC* vs WT, gènes surexprimés *csrA51* vs WT et gènes sous-exprimés Δ *csrBC* vs *csrA51* (Figure 1). Au contraire, les gènes dont les pools d'ARNm sont contrôlés positivement par CSR correspondront à l'intersection des groupes : gènes surexprimés Δ *csrBC* vs WT, gènes sous-exprimés *csrA51* vs WT et gènes surexprimés Δ *csrBC* vs *csrA51* (Figure 1). Des gènes de

référence, caractérisés comme cibles directes de CsrA seront utilisés pour valider la pertinence de l'approche. Par exemple le gène *glgC* et le gène *flhDC* pourront être utilisés comme référence de cibles respectivement négativement et positivement régulées par CSR. On s'attend par exemple à retrouver *glgC* parmi les gènes dont la concentration est négativement régulée par CSR et inversement pour *flhDC*.

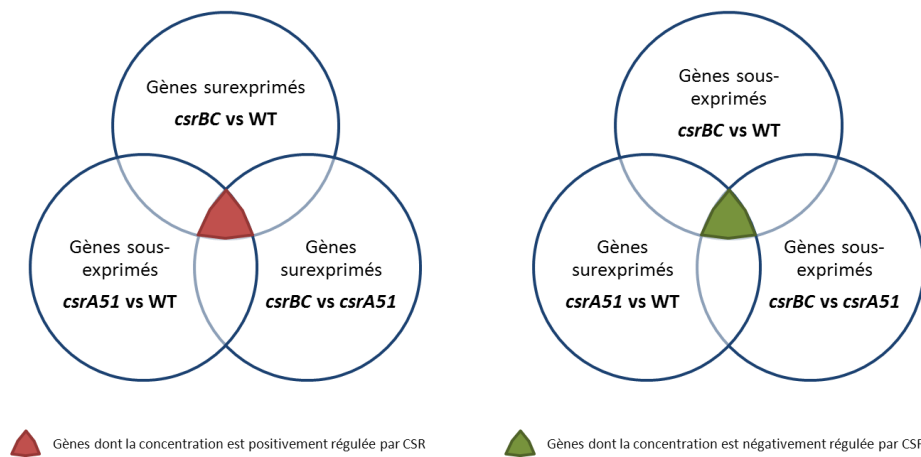


Figure 1 : Méthode de d'identification des gènes dont la concentration est sous contrôle de CSR

2. Comparaison des stabilomes des souches *csrA51*, *csrBC* et WT

Les stabilomes des deux souches *csrA51* et $\Delta csrBC$ seront obtenus à partir de la même procédure que celle décrite dans la partie « materials and methods » (stabilome analysis) du chapitre 3. Les stabilomes des trois souches seront comparés en utilisant le modèle global décrit dans le chapitre 3. Seuls seront analysés les ARNm dont le calcul du temps de demi-vie sera associé à un coefficient de variation compris entre 0 et 40 ($cv \in [0 ; 40]$). Tout comme l'analyse du transcriptome, les stabilomes seront analysés deux à deux : *csrA51* vs WT, $\Delta csrBC$ vs WT et $\Delta csrBC$ vs *csrA51*. Entre deux conditions, une différence significative de temps de demi-vie et donc de stabilité sera associée à une p-value (calculée par le modèle global) inférieure à 10%. En suivant la même logique que pour la comparaison des transcriptomes, les trois comparaisons nous permettront de déterminer les ARNm dont la stabilité est régulée par CSR. Les ARNm stabilisés par CSR correspondront aux ARNm appartenant à l'intersection des groupes : ARNm stabilisés $\Delta csrBC$ vs WT, ARNm déstabilisés *csrA51* vs WT et ARNm stabilisés $\Delta csrBC$ vs *csrA51* (Figure 2). Inversement, les ARNm déstabilisés par CSR seront ceux se

trouvant à l'intersection des groupes : ARNm déstabilisés $\Delta csrBC$ vs WT, ARNm stabilisés $csrA51$ vs WT et ARNm déstabilisés $\Delta csrBC$ vs $csrA51$ (Figure 2). Si les critères de *cv* pour les gènes *glgC* et *flhDC* sont respectés, nous nous attendons à trouver ces gènes dans le groupe « ARN stabilisé par CSR » (Figure 2) pour *flhDC* et dans le groupe « ARN déstabilisé par CSR » (Figure 2) pour *glgC*. Cette approche permettra d'identifier les cibles de CsrA et de les confronter avec d'autres résultats de la littérature (Edwards *et al.*, 2011 ; Esquerre *et al.*, (in preparation)).

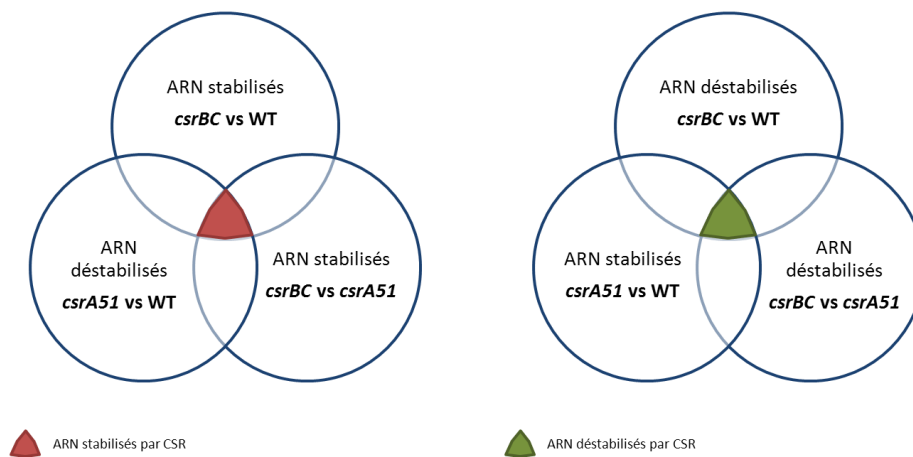


Figure 2 : Méthode d'identification des ARNm dont la stabilité est régulée par CSR

3. Caractérisation du contrôle de l'expression génique par CSR lors de la croissance

Une fois les comparaisons de transcriptomes et de stabilomes effectuées, nous déterminerons les contrôles responsables de la variation de concentration des ARNm entre les souches. Le caractère transcriptionnel ou dégradatif du contrôle des pools d'ARNm sera déterminé par le calcul des coefficients dégradatif et transcriptionnel entre deux souches : $csrA51$ vs WT, $\Delta csrBC$ vs WT et $\Delta csrBC$ vs $csrA51$. Cette approche permettra de déterminer les gènes dont le pool d'ARNm résulte de la régulation directe de la stabilité de leur ARNm par CSR (régulation dégradative) et les gènes dont le pool d'ARNm est indirectement régulé par CSR via la transcription (régulation transcriptionnelle). Les gènes dont le pool d'ARNm dépend de leur stabilisation par CSR se trouveront à l'intersection des groupes : surexprimés + contrôle dégradatif $\Delta csrBC$ vs WT, sous-exprimés + contrôle dégradatif $csrA51$ vs WT, surexprimés + contrôle dégradatif $\Delta csrBC$ vs $csrA51$ (Figure

3). Inversement, les gènes dont l'expression est régulée par leur déstabilisation par CSR correspondent aux gènes de l'intersection entre les groupes : sous-exprimés + contrôle dégradatif $\Delta csrBC$ vs WT, surexprimés + contrôle dégradatif $csrA51$ vs WT, sous-exprimés + contrôle dégradatif $\Delta csrBC$ vs $csrA51$ (Figure 3).

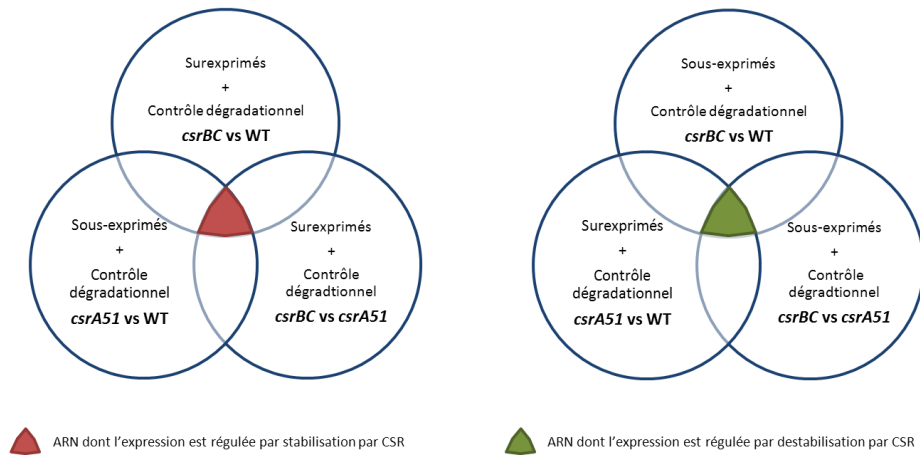


Figure 3: Méthode d'identification des gènes dont le pool d'ARNm est directement régulé par CSR lors de la croissance sur glucose.

Les gènes sous contrôle indirect de CSR seront identifiés de la même façon en remplaçant dans la figure 3, le critère « contrôle dégradatif » par le critère « contrôle transcriptionnel ».

Cette analyse complète caractérisera l'effet de CSR sur les pools d'ARNm et son étendue durant la croissance sur glucose. Le caractère direct (régulation de la stabilité) ou indirect (régulation de la transcription) des régulations par CSR pourra être établi grâce à ces travaux. Cependant, tout gène identifié comme cible directe de CSR devra être validé expérimentalement. Durant ce chapitre nous nous intéresserons tout particulièrement aux gènes glycolytiques dont les pools d'ARNm sont impactés dans le chapitre 1. Ainsi, nous pourrions approfondir notre analyse en déterminant si les pools d'ARNm glycolytiques observés résultent d'une absence de stabilisation de ces ARNm dans la souche $csrA51$ ou d'une modification de leur transcription. Ces informations pourront ensuite être utilisées et implémentées dans des modèles mathématiques afin de modéliser plus précisément la glycolyse et le métabolisme d'*E. coli*.

REFERENCES

Edwards, A.N., Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Mercante, J.W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M.I., Fields, J.A., Thompson, S.A., Georgellis, D., *et al.* (2011). Circuitry Linking the Csr and Stringent Response Global Regulatory Systems. *Mol. Microbiol.* *80*, 1561–1580.

Esquerre, T., Turlan, C., Bouvier, M., Carpousis, A.J., Cocaign-Bousquet, M., Girbal, L. Genome-wide extent of the Csr system on mRNA expression and stability in *Escherichia coli*. **(Submitted)**.

CONCLUSION
&
PERSPECTIVES

Le métabolisme carboné central (MCC) d'*E. coli* est soumis à de nombreuses régulations associées en réseaux, responsables de la robustesse du MCC (Sauer *et al.*, 1999) et de sa capacité d'adaptation. Comprendre le fonctionnement du MCC et élucider toutes ces régulations est un des enjeux actuels de la recherche en microbiologie tant sur le plan fondamental que biotechnologique. Cela permet d'une part de comprendre le développement et l'adaptation d'un micro-organisme dans son environnement et, dans le cas de micro-organismes pathogènes comme certaines souches d'*E. coli*, de déterminer de nouvelles cibles d'action et le développement de nouveaux traitements. D'autre part, en biotechnologies, cela confère de nouvelles pistes d'optimisation de l'utilisation des voies métaboliques à des fins spécifiques comme l'amélioration de procédés de production de molécules d'intérêt. Alors que de nombreuses informations sur les régulations transcriptionnelles ou post-traductionnelles du MCC sont disponibles et largement exploitées en biotechnologies par exemple, peu d'informations concernant les régulations post-transcriptionnelles, qui constitueraient de nouveaux outils d'action sur le MCC, sont disponibles.

La faible corrélation entre les niveaux de transcrits et les niveaux de protéines finaux dans le MCC témoigne de la présence et de l'importance des régulations post-transcriptionnelles (Lu *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2009; Picard *et al.*, 2009). Plusieurs études attestent d'une stabilisation générale des ARNm lors d'une transition métabolique entre une phase de croissance et une phase de carence chez différentes bactéries (Dressaire *et al.*, 2013; Redon *et al.*, 2005; Takayama and Kjelleberg, 2000). Une telle régulation présenterait un avantage énergétique durant une période de carence et permettrait de recourir plus rapidement à la production de protéines nécessaires en cas d'apparition de meilleures conditions nutritionnelles (Takayama and Kjelleberg, 2000). Chen *et al.*, (2015) ont également observé une augmentation du temps de demi-vie des ARNm à l'entrée en phase stationnaire chez *E. coli*. Cependant, leurs travaux se portent plus particulièrement sur l'analyse de la dégradation mesurée des ARNm qu'ils définissent comme la somme d'un résidu de la transcription par l'ADN polymérase après ajout de la rifampicine et de la dégradation réelle

de l'ARNm. Dès lors, aucun travail ou aucune analyse n'a été effectué pour déterminer l'impact de ces régulations post-transcriptionnelles dans l'adaptation métabolique d'*E. coli*.

L'analyse en dynamique du transcriptome et du stabilome de la souche d'*E. coli* K12 MG1655 au cours d'une culture glucose-acétate-carence carbone a permis de confirmer la stabilisation des ARNm chez *E. coli* en cas de carence avec un temps de demi-vie médian de 9,5 minutes (chapitre 3). Plus généralement, ces travaux ont mis en évidence une stabilisation des ARNm inversement corrélée à la disponibilité en carbone. Les variations de la stabilité des ARNm participent à la réorganisation de l'expression génique au cours des différentes adaptations métaboliques puisqu'elles contrôlent l'expression d'entre 14 et 19% des gènes au moment des transitions métaboliques (transitions glucose-acétate et acétate-carence – Figure bilan (p230)). La stabilisation des ARNm au moment de la transition glucose-acétate contrôle tout particulièrement l'expression des acteurs principaux de la réponse adaptative : les facteurs de transcription responsables de l'activation de l'expression des gènes associés à la réponse métabolique et les gènes régulant l'activité cellulaire au moment de l'arrêt de la croissance. Cette stabilisation constituerait un levier majeur dans la régulation de la réponse adaptative face à la disponibilité en nutriments. Dans les années 2000, l'augmentation de la traduction du facteur σ^S par l'action de petits ARN non codants sous le contrôle de la protéine Hfq a été mis en évidence au moment de la réponse à un stress thermique ou à un stress osmotique (Repoila *et al.*, 2003). Aujourd'hui, nos travaux contribuent à étendre et confirmer l'importance des régulations post-transcriptionnelles dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. Cependant, nos données ne permettent ni de déterminer les mécanismes sous-jacents à ces stabilisations (effet globaux ou régulations spécifiques) ni de quantifier réellement l'impact de ces régulations sur la réponse adaptative. Ces deux axes constituent les différentes perspectives à étudier afin de caractériser pleinement le rôle des régulations de la stabilité des ARNm dans cette adaptation. La détermination des mécanismes impliqués dans la stabilisation des ARNm est un prérequis à l'analyse de la contribution de ces régulations dans l'adaptation métabolique. En effet, une fois le mécanisme identifié, différentes méthodes pourront être utilisées pour les inhiber et ainsi mesurer les conséquences de la suppression de la stabilisation des ARNm lors de l'adaptation. Concernant les mécanismes impliqués dans la stabilisation, une modification de la structure secondaire

des ARNm ou l'action d'ARNnc associés à la protéine Hfq, font partie des premières pistes de recherche envisageables.

Par la suite, il sera possible de déterminer les contributions de ces régulations post-transcriptionnelles au niveau de l'expression génique. Dans un premier temps, il est nécessaire par une approche similaire à la HRA de déterminer les contributions générales de la transcription, des régulations post-transcriptionnelles et des régulations post-traductionnelles sur la variation de la quantité de protéine active (Daran-Lapujade *et al.*, 2007). Ensuite, les régulations post-transcriptionnelles pourront être divisées en régulations associées à des effets globaux et en régulations par des mécanismes spécifiques. Les contributions des effets globaux et spécifiques sur les régulations post-transcriptionnelles peuvent être calculées à partir d'approches similaires à celle du calcul des coefficients de corrélation utilisée dans le chapitre 3. Nous pouvons envisager de définir la variation de la constante de dégradation k comme la somme d'effets globaux et d'effets spécifiques et de définir ensuite un coefficient représentant le poids de chaque effet. Le coefficient associé au poids des effets spécifiques pourra être calculé à partir de données de transcriptome et de stabilome de la souche sauvage et d'une souche chez laquelle le mécanisme dégradationnel spécifique aura été inhibé. Dans le cas de régulations spécifiques par des régulateurs post-transcriptionnels comme CSR ou Hfq, ces calculs permettront de déterminer leur contribution réelle à l'échelle des régulations-post-transcriptionnelles et plus globalement dans la régulation de l'expression génique.

Depuis quelques années, le régulateur global post-transcriptionnel CSR est décrit comme un régulateur du MCC (Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000), essentiel aux cellules pour une croissance sur glucose (Altier *et al.*, 2000; Timmermans and Melderer, 2009) et probablement impliqué dans la régulation des transitions métaboliques (Pernestig *et al.*, 2003). Alors que son rôle dans la régulation du MCC n'est pas encore caractérisée, une première étude a mis en évidence son potentiel d'utilisation comme régulateur du MCC à des fins biotechnologiques (McKee *et al.*, 2012). Ceci souligne un réel

intérêt de comprendre et caractériser l'implication de ce régulateur post-transcriptionnel particulier dans la régulation et l'adaptation du MCC chez *E. coli*.

Nos travaux de recherches sur le système CSR et son rôle dans la régulation du MCC chez *E. coli* ont permis d'étudier à la fois son implication dans la régulation du MCC lors d'une croissance sur glucose et lors d'une transition métabolique glucose-acétate.

Lors d'une croissance sur glucose, CSR joue un rôle déterminant dans la régulation de la concentration des ARNm glycolytiques (chapitre 1- Figure bilan (p230)). Ces pools d'ARNm diminuent considérablement suite à la diminution de l'activité de CsrA (effecteur principal du système CSR), ce qui provoque un dérèglement du métabolisme glycolytique et une réorganisation du MCC. La diminution des pools d'ARNm entraîne une diminution de la quantité des enzymes associées qui se répercute alors sur les flux métaboliques. Cet effet est particulièrement important au niveau de l'enzyme PfkA (phosphofructokinase) et provoque un stress aux hexoses phosphate contrecarrant l'entrée du glucose et de fait la croissance. Ce stress aux hexoses phosphate explique en partie l'essentialité de CSR sur glucose et non l'accumulation de glycogène comme pouvait l'envisager Timmermans et Van Melderer (2009). Alors qu'une diminution des activités des enzymes glycolytiques avait déjà été observée dans un mutant de type *csrA51* (Sabnis *et al.*, 1995), les conséquences sur une croissance sur glucose n'avaient pu être mesurées car les cultures n'étaient pas conduites en milieu minimum mais en milieu Kornberg supplémenté en glucose. Dorénavant, nos travaux exposent le système CSR comme un régulateur des pools d'ARNm glycolytiques, nécessaire à l'optimisation des flux métaboliques et à la croissance (Figure bilan (p 230)). Des travaux actuellement en cours (chapitre 4) permettront de déterminer si CSR régule ces concentrations d'ARNm en stabilisant directement les ARNm ou indirectement en activant leur transcription. Ces derniers résultats obtenus, nous disposerons d'une explication majeure concernant l'essentialité de CSR dans la régulation du MCC lors de la croissance sur glucose. La régulation de la glycolyse par CSR s'ajoute ainsi au réseau complexe de régulations déjà caractérisées.

L'implémentation des régulations CSR dans des modèles mathématiques associés à la modélisation du MCC et de la glycolyse comme ceux de Chassagnoles ou Peskov (Chassagnole

et al., 2002; Peskov *et al.*, 2012) est une des perspectives à long terme de ces travaux. Cela permettra d'une part de caractériser la place des régulations CSR parmi les autres régulations intégrées dans le modèle et d'autre part d'améliorer la précision de ces modèles prédictifs. L'intégration des régulations par CSR devra se faire différemment en cas de régulations directes et en cas de régulations indirectes. La régulation directe touchant à la stabilité de l'ARNm et/ou l'initiation de la traduction, elle pourra se trouver au niveau de la quantité de l'ARNm et/ou sur la quantité de la protéine (dans la définition du V_{max}). En cas de régulation indirecte, on peut imaginer intégrer la régulation par CSR au niveau de la composante transcriptionnelle.

Dans son environnement naturel, *E. coli* a accès à différentes sources carbonées dont le glucose ne fait pas forcément partie. Il est donc nécessaire d'étudier également le rôle de CSR dans la régulation d'autres métabolismes de croissance, notamment ceux observés par *E. coli* dans le colon. Chez la souche *E. coli* Nissle 1917, Revelles *et al.*, (2013) ont mis en évidence des différences de croissance d'un mutant de type *csrA51* sur une large gamme de substrats carbonés (substrats glycolytiques, de la voie des pentoses-phosphate, de la voie d'Entner-Doudoroff ou encore substrats gluconéogéniques) témoignant de l'implication de CSR dans la régulation d'autres métabolismes de croissance. Maintenant, une approche similaire à celle développée dans le chapitre 1 doit être utilisée lors de croissance en milieux minimums supplémentés avec ces différents substrats pour caractériser l'impact réel de CSR dans la croissance sur chacun de ces composés. Cette approche sur source gluconéogénique contribuerait notamment à confirmer les travaux de Romeo *et al.*, (1993) témoignant d'une régulation négative de la gluconéogenèse par CSR (Romeo *et al.*, 1993; Sabnis *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000). Finalement, analyser l'implication de CSR dans la régulation du métabolisme de sources carbonées consommées plus particulièrement par les souches d'*E. coli* pathogènes (exemple pour la souche d'*E. coli* O157:H7 : hexuronates, galacturonate, mannose ou ribose (Fabich *et al.*, 2008)) permettrait de savoir si CSR est déterminant dans le métabolisme de tels substrats. Auquel cas, la régulation de l'action de CSR pourrait être une nouvelle stratégie de traitements contre ces souches d'*E. coli* pathogènes.

La transition glucose-acétate est caractérisée au niveau des ARNm par une diminution des concentrations des ARNm glycolytiques et l'augmentation des ARNm des gènes gluconéogéniques comme *acs* et *pckA* (Enjalbert *et al.*, 2013, 2015 ; chapitre 3). Dans la littérature, CSR est présenté comme régulant négativement l'expression de *pck* et positivement celle d'*acs* et *icl* (Wei *et al.*, 2000; Wolfe, 2005). Etant donné l'effet de CSR sur les concentrations des ARNm glycolytiques (chapitre 1), il est fort probable que CSR soit impliqué dans la régulation des pools d'ARNm métaboliques au moment de la transition glucose acétate. Cependant, l'analyse des profils d'évolution des pools d'ARNm lors de la transition n'a montré aucune différence significative des pools d'ARNm entre une souche sauvage et des mutants du système CSR (chapitre 2). L'analyse en dynamique du transcriptome et du stabilome de la souche sauvage au moment de la transition glucose-acétate (chapitre 3) a montré qu'une quinzaine de gènes sous contrôle dégradatif appartenait au régulon de CSR déterminé par Esquerre *et al.*, (soumis). L'analyse du régulon CSR ayant été menée sur un nombre réduit de gènes, CSR serait potentiellement impliqué dans la régulation des pools d'ARNm d'au moins 15 gènes durant la transition (Figure bilan (p230)). Ceci réduit nettement l'implication des régulations post-transcriptionnelles CSR-dépendantes au moment de cette adaptation métabolique, d'autant plus que les 15 gènes identifiés dans le chapitre 3 sont indépendants du MCC. Cependant, la production des données de stabilome et de transcriptome de mutants CSR au moment de la transition et leur comparaison avec les données de la souche sauvage (chapitre 3) permettront d'améliorer ces observations.

Malgré l'absence d'effet du système CSR sur l'expression génique au moment de la transition glucose-acétate, il serait faux d'affirmer que CSR n'impacte pas la capacité d'adaptation métabolique d'*E. coli*. L'utilisation de différents mutants du système CSR a montré une différence dans la dynamique de re-consommation de l'acétate après la disparition du glucose : un mutant dont l'activité de CsrA est fortement réprimée ($\Delta csrD$) re-consomme l'acétate plus tôt que le mutant inverse ($\Delta csrBC$) dont l'activité de CsrA n'est pas contrôlée. Nous avons montré que cette différence était due à une différence de contenu glycogénique au moment de la disparition du glucose. Ce glycogène confère un avantage adaptatif dans la dynamique de la transition en contribuant à la production de l'énergie

intracellulaire nécessaire à la reprogrammation de l'activité cellulaire vers la consommation d'acétate. Historiquement, l'accumulation de glycogène intracellulaire est le premier phénomène régulé par le système CSR mis en évidence (Romeo *et al.*, 1993). La synthèse et la dégradation du glycogène sont deux voies annexes mais connectées aux voies de la glycolyse et de la gluconéogenèse, les deux voies métaboliques directement associées à la transition glucose-acétate. Ainsi, en régulant post-transcriptionnellement un métabolisme annexe, CSR impacte indirectement la transition métabolique entre glucose et acétate (Figure bilan (p 230)).

Etant donné que le glycogène favorise l'adaptation en maintenant la charge énergétique des cellules et que son stockage n'est pas un frein à la croissance, nous pourrions nous demander pourquoi les cellules n'en accumulent pas plus. Il est probable qu'une trop grande quantité de glycogène compromette une transition métabolique. En effet, nous avons vu que la souche *csrA51*, qui accumule jusqu'à 30% de sa masse sèche en glycogène, s'adapte beaucoup moins rapidement que la souche *csrA51* ne produisant pas de glycogène (*csrA51ΔglgC*) quand les cellules sont transférées manuellement d'un milieu contenant du glucose à un milieu contenant de l'acétate. Suite au transfert, la dégradation du glycogène de la souche *csrA51* alimente les pools de métabolites de la glycolyse et limite la mise en place de la gluconéogenèse. Il est alors fort probable, qu'une trop grande quantité de glycogène chez un WT, au moment d'une transition métabolique, contrecarrerait la mise en place d'un nouveau métabolisme en entretenant la glycolyse. Finalement, CSR permet d'optimiser indirectement la transition en limitant le contenu glycogénique des cellules à une quantité suffisante pour procurer l'énergie favorable à la transition mais assez limitée pour ne pas maintenir un métabolisme glycolytique. C'est pourquoi CSR, malgré l'absence de régulations post-transcriptionnelles avérées au moment de la transition, est un régulateur important de cette adaptation métabolique.

Pernetig *et al.*, (2003) évoquaient l'implication potentielle du système CSR lors d'une transition métabolique vers un substrat gluconéogénique compte tenu de la meilleure adaptabilité au long terme d'un mutant *ΔuvrY* sur substrat gluconéogénique par rapport à une souche WT et de la régulation de CSR par le système à double composante BarA/UvrY.

Pernestig *et al.*, supposent qu'un mutant de type $\Delta csrBC$ (la délétion de *uvrY* aboutissant à une diminution de la transcription de CsrB et CsrC) présenterait une meilleure adaptabilité au long terme qu'un WT. Leurs résultats étant obtenus 5 jours après la transition, il est difficile de parler de transition ou d'adaptation comme nous le définissons dans ces travaux. Ici, nous démontrons qu'au moment de la transition et des quelques heures qui suivent, un mutant $\Delta csrBC$, au contraire, s'adapte plus lentement qu'une souche sauvage à cause de l'absence de glycogène. Dès lors, la meilleure adaptabilité du mutant $\Delta uvrY$, serait associée au fait que CSR puisse être un régulateur de la croissance sur substrat gluconéogénique au même titre que sur substrat glycolytique, plutôt qu'à un rôle de CSR dans la transition d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme gluconéogénique. L'analyse de l'effet de CSR sur une croissance sur substrat gluconéogénique proposée ci-dessus permettra de répondre à cette observation.

Maintenant, il est nécessaire de tester d'autres transitions métaboliques pour étudier le rôle de CSR dans la régulation de l'adaptation métabolique en général. Existe-t-il des transitions métaboliques durant lesquelles les régulations post-transcriptionnelles par CSR sont essentielles? Le rôle de CSR dans une transition est-il toujours associé à la régulation du glycogène? Voici autant de questions qui doivent être abordées dans les perspectives de ces travaux. L'utilisation des mutants $\Delta glgC$ permettra notamment de caractériser l'impact du glycogène dans chacune des transitions. Etant donné le rôle majeur de CSR dans la mise en place de la glycolyse, il serait notamment intéressant d'étudier le rôle de CSR d'une transition métabolique aboutissant à la mise en place de la glycolyse. La transition inverse de celle utilisée durant ces travaux, la transition acétate-glucose, pourrait être un modèle adapté. De nombreux indices soulignent l'implication de CSR dans la régulation de l'entrée en phase stationnaire : activation de la transcription de CsrA par σ^S (Yakhnin *et al.*, 2011), accumulation de CsrA à l'entrée en phase stationnaire (Guadapaty *et al.*, 2001), activation de la transcription de CsrB et CsrC par ppGpp (Edwards *et al.*, 2011). La caractérisation du rôle de CSR dans la régulation de l'entrée en phase stationnaire, son intégration par rapport aux régulations existantes font partie des travaux indispensables de l'étude de CSR dans la régulation de l'adaptation métabolique. De plus, compte tenu de l'interaction complexe entre la réponse stringente et CSR, l'étude du rôle de CSR dans l'adaptation à une carence en acides aminés est

également une perspective de ces travaux. Une approche similaire à celle développée dans le chapitre 2 pourra être utilisée pour étudier le rôle de CSR dans ces transitions métaboliques.

En conclusion ces travaux de thèse ont permis de répondre aux questions établies au début de ce manuscrit (Figure bilan (p230)) : (i) quelle est l'implication du système CSR dans la régulation d'un métabolisme de croissance sur glucose? (ii) joue-t-il un rôle dans la régulation d'une transition métabolique? (iii) globalement, qu'elle est l'importance des régulations post-transcriptionnelles, et plus particulièrement celles associées au système CSR, dans la régulation de l'expression génique face à la disponibilité en carbone? Dans le cadre de cette étude, le système CSR s'apparente plutôt à un régulateur direct et indispensable du métabolisme glycolytique lors de la phase exponentielle sur substrat glycolytique et non à un régulateur de la réorganisation de l'expression génique lors de transition métabolique. Cependant, son contrôle de la transition glucose-acétate s'observe à un tout autre niveau : en régulant initialement le stockage du glycogène, CSR régule l'approvisionnement en énergie favorable à la transition tout en limitant les effets antagonistes d'une trop grande quantité de glycogène.

Que ce soit par son rôle direct de régulateur post-transcriptionnel et la régulation de pools d'ARNm sur glucose ou par son impact indirect notamment sur le maintien des pools énergétiques de la cellule lors de la transition, CSR est un régulateur incontournable du MCC en phase stationnaire et en phase d'adaptation. Plus généralement, de par la variété des phénomènes physiologiques régulés directement par CSR et leur interconnexion avec le reste des processus physiologiques, l'impact de CSR s'étend au-delà d'un simple contrôle post-transcriptionnel et sûrement à l'ensemble des processus cellulaires. Ceci fait de CSR un régulateur essentiel dans la cellule et un élément central pour toute étude physiologique ou biotechnologique d'*E. coli*.

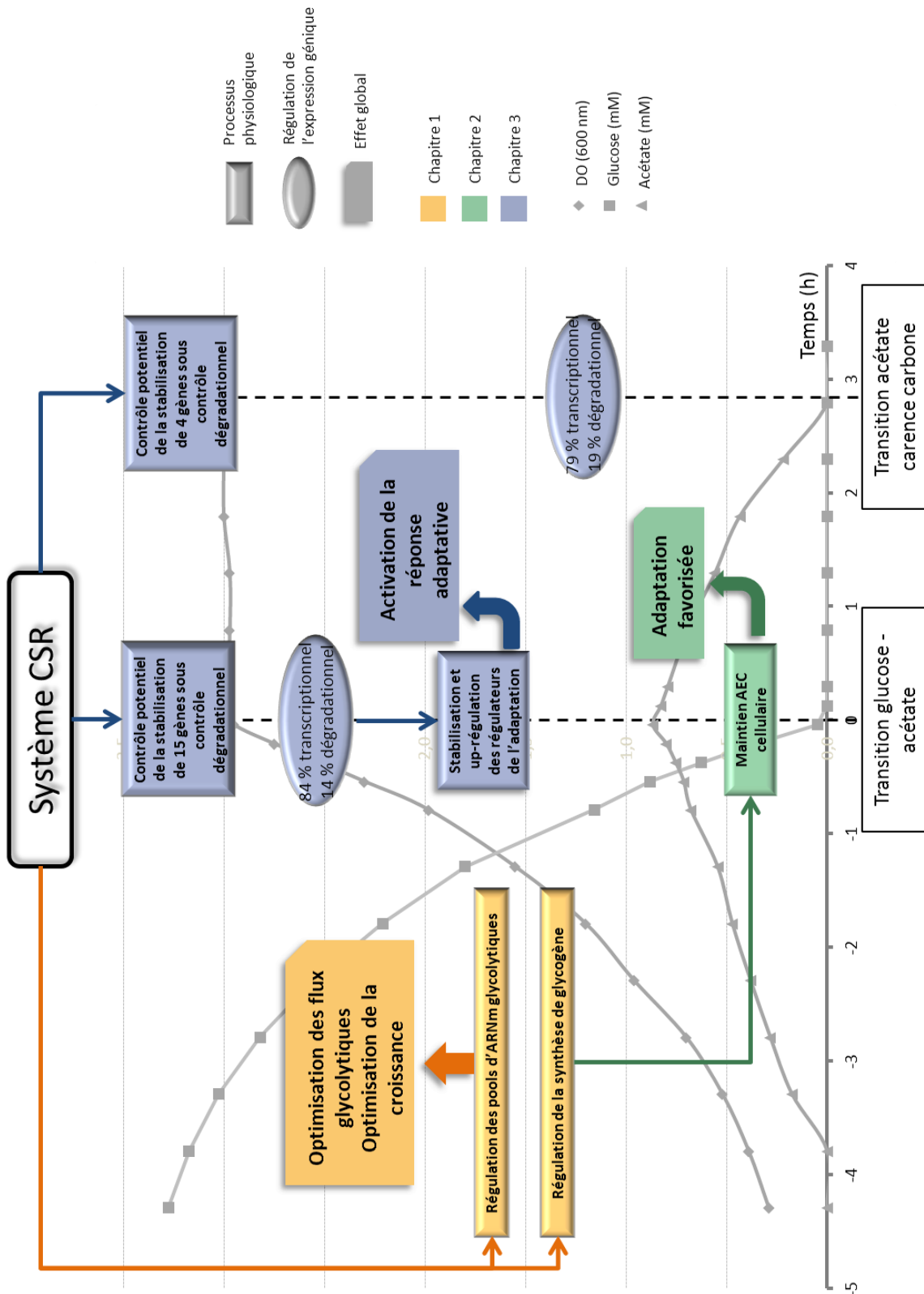


Figure bilan : Rôle des régulations par le système CSR lors de l'adaptation métabolique d'*Escherichia coli*

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Etude bibliographique

Conclusion & Perspectives

- Aberg, A., Fernández-Vázquez, J., Cabrer-Panes, J.D., Sánchez, A., and Balsalobre, C. (2009). Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *191*, 3226–3236.
- Adamson, D.N., and Lim, H.N. (2013). Rapid and robust signaling in the CsrA cascade via RNA-protein interactions and feedback regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 13120–13125.
- Ades, S.E. (2008). Regulation by destruction: design of the sigmaE envelope stress response. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 535–540.
- Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., and Gross, C.A. (1999). The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev.* *13*, 2449–2461.
- Adler, J. (1976). Chemotaxis in bacteria. *J. Supramol. Struct.* *4*, 305–317.
- Albertson, N.H., and Nyström, T. (1994). Effects of starvation for exogenous carbon on functional mRNA stability and rate of peptide chain elongation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* *117*, 181–187.
- Alonso-Casajus, N., Dauvillee, D., Viale, A.M., Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Eydallin, G., Ball, S., and Pozueta-Romero, J. (2006). Glycogen Phosphorylase, the Product of the glgP Gene, Catalyzes Glycogen Breakdown by Removing Glucose Units from the Nonreducing Ends in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *188*, 5266–5272.
- Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, S.D. (2000). Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Invasion Genes by *csrA*. *Infect. Immun.* *68*, 6790–6797.
- D'Ari, R. (1985). The SOS system. *Biochimie* *67*, 343–347.
- Arnold, T.E., Yu, J., and Belasco, J.G. (1998). mRNA stabilization by the *ompA* 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA N. Y. N* *4*, 319–330.
- Azam, T.A., and Ishihama, A. (1999). Twelve Species of the Nucleoid-associated Protein from *Escherichia coli* sequence recognition specificity and dna binding affinity. *J. Biol. Chem.* *274*, 33105–33113.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* *2*, 2006.0008.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 156–163.
- Bachmann, B. (1996). Derivation and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, (Washington: ASM Press), pp. 2460–2488.
- Baev, M.V., Baev, D., Radek, A.J., and Campbell, J.W. (2006). Growth of *Escherichia coli* MG1655 on LB medium: monitoring utilization of sugars, alcohols, and organic acids with transcriptional microarrays. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *71*, 310–316.

- Baker, C.S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., and Babitzke, P. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of glgC in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *44*, 1599–1610.
- Baker, C.S., Eory, L.A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T., and Babitzke, P. (2007). CsrA Inhibits Translation Initiation of *Escherichia coli* hfq by Binding to a Single Site Overlapping the Shine-Dalgarno Sequence. *J. Bacteriol.* *189*, 5472–5481.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A., and Preiss, J. (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *67*, 213–225, table of contents.
- Ballicora, M.A., Erben, E.D., Yazaki, T., Bertolo, A.L., Demonte, A.M., Schmidt, J.R., Aleanzi, M., Bejar, C.M., Figueroa, C.M., Fusari, C.M., *et al.* (2007). Identification of regions critically affecting kinetics and allosteric regulation of the *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase by modeling and pentapeptide-scanning mutagenesis. *J. Bacteriol.* *189*, 5325–5333.
- Barker, M.M., Gaal, T., and Gourse, R.L. (2001a). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Biol.* *305*, 689–702.
- Barker, M.M., Gaal, T., Josaitis, C.A., and Gourse, R.L. (2001b). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* *305*, 673–688.
- Battesti, A., and Gottesman, S. (2013). Roles of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 140–147.
- Beg, Q.K., Vazquez, A., Ernst, J., de Menezes, M.A., Bar-Joseph, Z., Barabási, A.-L., and Oltvai, Z.N. (2007). Intracellular crowding defines the mode and sequence of substrate uptake by *Escherichia coli* and constrains its metabolic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12663–12668.
- Begley, G.S., Hansen, D.E., Jacobson, G.R., and Knowles, J.R. (1982). Stereochemical course of the reactions catalyzed by the bacterial phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system. *Biochemistry (Mosc.)* *21*, 5552–5556.
- Bennett, B.D., Kimball, E.H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S.J., and Rabinowitz, J.D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 593–599.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.-H., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 9697–9702.
- Berthoumieux, S., de Jong, H., Baptist, G., Pinel, C., Ranquet, C., Ropers, D., and Geiselman, J. (2013). Shared control of gene expression in bacteria by transcription factors and global physiology of the cell. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 634.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T., and Gilles, E.-D. (2006). A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *281*, 2578–2584.

- Bhatt, S., Edwards, A.N., Nguyen, H.T.T., Merlin, D., Romeo, T., and Kalman, D. (2009). The RNA Binding Protein CsrA Is a Pleiotropic Regulator of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* *77*, 3552–3568.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 273–297.
- Blangy, D., Buc, H., and Monod, J. (1968). Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *31*, 13–35.
- Błaszczuk, U., Polit, A., Guz, A., and Wasylewski, Z. (2001). Interaction of cAMP receptor protein from *Escherichia coli* with cAMP and DNA studied by dynamic light scattering and time-resolved fluorescence anisotropy methods. *J. Protein Chem.* *20*, 601–610.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., *et al.* (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* *277*, 1453–1462.
- Bobrovskyy, M., and Vanderpool, C.K. (2013). Regulation of Bacterial Metabolism by Small RNAs Using Diverse Mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* *47*, 209–232.
- Boelens, R., and Gualerzi, C.O. (2002). Structure and function of bacterial initiation factors. *Curr. Protein Pept. Sci.* *3*, 107–119.
- Borirak, O., Bekker, M., and Hellingwerf, K.J. (2014). Molecular physiology of the dynamic regulation of carbon catabolite repression in *Escherichia coli*. *Microbiology* *160*, 1214–1223.
- Bougdour, A., and 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., and Gottesman, S. (2006). Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *20*, 884–897.
- Boulineau, S., Tostevin, F., Kiviet, D.J., Wolde, P.R. ten, Nghe, P., and Tans, S.J. (2013). Single-Cell Dynamics Reveals Sustained Growth during Diauxic Shifts. *PLoS ONE* *8*, e61686.
- Bouvier, M., and Carpousis, A.J. (2011). A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol. Microbiol.* *82*, 1305–1310.
- Bouvier, M., Sharma, C.M., Mika, F., Nierhaus, K.H., and Vogel, J. (2008). Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol. Cell* *32*, 827–837.
- Bremer, H.C., and Dennis, P.P. (1996). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, (Washington: ASM Press), pp. 1553–1569.
- Bremer, H., Dennis, P., and Ehrenberg, M. (2003). Free RNA polymerase and modeling global transcription in *Escherichia coli*. *Biochimie* *85*, 597–609.
- Brückner, R., and Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* *209*, 141–148.

- Brzowska, I., and Zielenkiewicz, U. (2013). Regulation of toxin–antitoxin systems by proteolysis. *Plasmid* 70, 33–41.
- Burgard, A.P., and Maranas, C.D. (2003). Optimization-based framework for inferring and testing hypothesized metabolic objective functions. *Biotechnol. Bioeng.* 82, 670–677.
- Büscher, J.M., Czernik, D., Ewald, J.C., Sauer, U., and Zamboni, N. (2009). Cross-Platform Comparison of Methods for Quantitative Metabolomics of Primary Metabolism. *Anal Chem* 81 (6), 2135–2143.
- Camacho, M.I., Alvarez, A.F., Chavez, R.G., Romeo, T., Merino, E., and Georgellis, D. (2014). Effects of the global regulator CsrA on the BarA/UvrY two-component signaling system. *J. Bacteriol.* JB.02325–14.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., and Darst, S.A. (2001). Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104, 901–912.
- Caron, M.-P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., and Lafontaine, D.A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3444–E3453.
- Carpousis, A.J. (2002). The Escherichia coli RNA degradosome: structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 150–155.
- Carpousis, A.J. (2007). The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 71–87.
- Carpousis, A.J., Van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994). Copurification of E. coli RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell* 76, 889–900.
- Carpousis, A.J., Luisi, B.F., and McDowall, K.J. (2009). Endonucleolytic initiation of mRNA decay in Escherichia coli. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85, 91–135.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V., and Vinella, D. (1996). The Stringent Response. In *Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, (Washington: ASM Press), pp. 1458–1496.
- Castaño-Cerezo, S., Bernal, V., Post, H., Fuhrer, T., Cappadona, S., Sánchez-Díaz, N.C., Sauer, U., Heck, A.J., Altelaar, A.M., and Cánovas, M. (2014). Protein acetylation affects acetate metabolism, motility and acid stress response in Escherichia coli. *Mol. Syst. Biol.* 10, n/a – n/a.
- Chandu, D., and Nandi, D. (2004). Comparative genomics and functional roles of the ATP-dependent proteases Lon and Clp during cytosolic protein degradation. *Res. Microbiol.* 155, 710–719.
- Chang, D.-E., Smalley, D.J., Tucker, D.L., Leatham, M.P., Norris, W.E., Stevenson, S.J., Anderson, A.B., Grissom, J.E., Laux, D.C., Cohen, P.S., *et al.* (2004). Carbon nutrition of Escherichia coli in the mouse intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7427–7432.
- Chang, H.-W., Yang, T.-Y., Lei, G.-S., and Chak, K.-F. (2013). A Novel Endogenous Induction of ColE7 Expression in a csrA Mutant of Escherichia coli. *Curr. Microbiol.* 66, 392–397.

- Chassagnole, C., Noisommit-Rizzi, N., Schmid, J.W., Mauch, K., and Reuss, M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* *79*, 53–73.
- Chaudhuri, R.R., and Henderson, I.R. (2012). The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect. Genet. Evol.* *12*, 214–226.
- Chen, H., Shiroguchi, K., Ge, H., and Xie, X.S. (2015). Genome-wide study of mRNA degradation and transcript elongation in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* *11*, 808.
- Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R., and Jay, E. (1994). Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4953–4957.
- Coen, M., Holmes, E., Lindon, J.C., and Nicholson, J.K. (2008). NMR-based metabolic profiling and metabolomic approaches to problems in molecular toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* *21*, 9–27.
- Cook, K.B., Hughes, T.R., and Morris, Q.D. (2015). High-throughput characterization of protein–RNA interactions. *Brief. Funct. Genomics* *14*, 74–89.
- Covert, M.W., and Palsson, B.Ø. (2002). Transcriptional regulation in constraints-based metabolic models of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *277*, 28058–28064.
- Covert, M.W., Schilling, C.H., Famili, I., Edwards, J.S., Goryanin, I.I., Selkov, E., and Palsson, B.O. (2001a). Metabolic modeling of microbial strains in silico. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 179–186.
- Covert, M.W., Schilling, C.H., and Palsson, B. (2001b). Regulation of gene expression in flux balance models of metabolism. *J. Theor. Biol.* *213*, 73–88.
- Craig, E.A., Gambill, B.D., and Nelson, R.J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* *57*, 402–414.
- Croucher, N.J., and Thomson, N.R. (2010). Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 619–624.
- Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 26–38.
- Dame, R.T. (2005). The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.* *56*, 858–870.
- Daran-Lapujade, P., Rossell, S., van Gulik, W.M., Luttik, M.A.H., de Groot, M.J.L., Slijper, M., Heck, A.J.R., Daran, J.-M., de Winde, J.H., Westerhoff, H.V., *et al.* (2007). The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15753–15758.
- Darst, S.A., Kubalek, E.W., and Kornberg, R.D. (1989). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography. *Nature* *340*, 730–732.
- Dauvillée, D., Kinderf, I.S., Li, Z., Kosar-Hashemi, B., Samuel, M.S., Rampling, L., Ball, S., and Morell, M.K. (2005). Role of the *Escherichia coli* *glgX* gene in glycogen metabolism. *J. Bacteriol.* *187*, 1465–1473.

- Dawes, E.A., and Senior, P.J. (1973). The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Microorganisms. In *Advances in Microbial Physiology*, A.H.R. and D.W. Tempest, ed. (Academic Press), pp. 135–266.
- Death A, Ferenci T. (1993). The importance of the binding-protein-independent Mgi system to the transport of glucose in *Escherichia coli* growing on low sugar concentrations. *Res. Microbiol.* *144*, 529–537.
- Dennis, P.P., Ehrenberg, M., and Bremer, H. (2004). Control of rRNA Synthesis in *Escherichia coli*: a Systems Biology Approach. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 639–668.
- Desnoyers, G., Bouchard, M.-P., and Massé, E. (2013). New insights into small RNA-dependent translational regulation in prokaryotes. *Trends Genet.* *29*, 92–98.
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 87–93.
- Deutscher, M.P. (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* *34*, 659–666.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006). How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *70*, 939–1031.
- Dillon, S.C., and Dorman, C.J. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 185–195.
- Dong, T., Kirchhof, M.G., and Schellhorn, H.E. (2008). RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. *Mol. Genet. Genomics MGG* *279*, 267–277.
- Dougan, D.A., Mogk, A., and Bukau, B. (2002). Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *59*, 1607–1616.
- Dressaire, C., Picard, F., Redon, E., Loubière, P., Queinnec, I., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2013). Role of mRNA Stability during Bacterial Adaptation. *PLoS ONE* *8*, e59059.
- Dreyfus, M., and Régnier, P. (2002). The Poly(A) Tail of mRNAs: Bodyguard in Eukaryotes, Scavenger in Bacteria. *Cell* *111*, 611–613.
- Drlica, K., and Rouviere-Yaniv, J. (1987). Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.* *51*, 301–319.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Suzuki, K., Jones, A.D., Pandit, P., Romeo, T., and Babitzke, P. (2003). CsrA Regulates Translation of the *Escherichia coli* Carbon Starvation Gene, *cstA*, by Blocking Ribosome Access to the *cstA* Transcript. *J. Bacteriol.* *185*, 4450–4460.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005). RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA–RNA interaction. *RNA* *11*.
- Durfee, T., Hansen, A.-M., Zhi, H., Blattner, F.R., and Jin, D.J. (2008). Transcription Profiling of the Stringent Response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *190*, 1084–1096.

- Duval, M., Simonetti, A., Caldelari, I., and Marzi, S. Multiple ways to regulate translation initiation in bacteria: Mechanisms, regulatory circuits, dynamics. *Biochimie*.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., and Relman, D.A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Edwards, A.N., Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Mercante, J.W., Potrykus, K., Vinella, D., Camacho, M.I., Fields, J.A., Thompson, S.A., Georgellis, D., *et al.* (2011b). Circuitry Linking the Csr and Stringent Response Global Regulatory Systems. *Mol. Microbiol.* 80, 1561–1580.
- Edwards, J.S., Ibarra, R.U., and Palsson, B.O. (2001). In silico predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nat. Biotechnol.* 19, 125–130.
- Edwards, J.S., Covert, M., and Palsson, B. (2002). Metabolic modelling of microbes: the flux-balance approach. *Environ. Microbiol.* 4, 133–140.
- Ehrenberg, M., Bremer, H., and Dennis, P.P. (2013). Medium-dependent control of the bacterial growth rate. *Biochimie* 95, 643–658.
- Enjalbert, B., Letisse, F., and Portais, J.-C. (2013). Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*. *Metabolites* 3, 820–837.
- Enjalbert B, Coccagn-Bousquet M, Portais J-C, Letisse F. 2015. Acetate exposure determines the diauxic behavior of *Escherichia coli* during the glucoseacetate transition. *J Bacteriol* 197,3173–3181.
- Enz, S., Braun, V., and Crosa, J.H. (1995). Transcription of the region encoding the ferric dicitrate-transport system in *Escherichia coli*: similarity between promoters for *fecA* and for extracytoplasmic function sigma factors. *Gene* 163, 13–18.
- Esquerré, T., Laguerre, S., Turlan, C., Carpousis, A.J., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2014). Dual role of transcription and transcript stability in the regulation of gene expression in *Escherichia coli* cells cultured on glucose at different growth rates. *Nucleic Acids Res.* 42, 2460–2472.
- Esquerre, T., Moisan, A., Chiapello, H., Ariike, L., Vilu, R., Gaspin, C., Coccagn-Bousquet, M., and Girbal, L. (2015). Genome-wide investigation of mRNA lifetime determinants in *Escherichia coli* cells cultured at different growth rates. *BMC Genomics*.
- Esquerre, T., Turlan, C., Bouvier, M., Carpousis, A.J., Coccagn-Bousquet, M., Girbal, L. Genome-wide extent of the Csr system on mRNA expression and stability in *Escherichia coli*. **(Submitted)**.
- van Eunen, K., Rossell, S., Bouwman, J., Westerhoff, H.V., and Bakker, B.M. (2011). Quantitative analysis of flux regulation through hierarchical regulation analysis. *Methods Enzymol.* 500, 571–595.
- Fabich, A.J., Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., McHargue, J.W., Hightower, G.A., Smith, J.T., Autieri, S.M., *et al.* (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect. Immun.* 76, 1143–1152.
- Feist, A.M., and Palsson, B.O. (2010). The biomass objective function. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 344–349.

- Feng, L., and Niu, D.-K. (2007). Relationship between mRNA stability and length: an old question with a new twist. *Biochem. Genet.* *45*, 131–137.
- Fiehn O. (2008). Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Trac-Trend Anal Chem*, *27*, 261–269
- Filiatrault, M.J. (2011). Progress in prokaryotic transcriptomics. *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 579–586.
- Fraenkel, D.G., Kotlarz, D., and Buc, H. (1973). Two Fructose 6-Phosphate Kinase Activities in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *248*, 4865–4866.
- Fröhlich, K.S., and Vogel, J. (2009). Activation of gene expression by small RNA. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 674–682.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S.T., Nguyen, L.H., Burgess, R.R., and Gourse, R.L. (2001). Promoter recognition and discrimination by *EsigmaS* RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* *42*, 939–954.
- Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Nguyen, L.H., Jensen, D.B., and Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* *175*, 7982–7989.
- Georgellis, D., Barlow, T., Arvidson, S., and von Gabain, A. (1993). Retarded RNA turnover in *Escherichia coli*: a means of maintaining gene expression during anaerobiosis. *Mol. Microbiol.* *9*, 375–381.
- Gerosa, L., and Sauer, U. (2011). Regulation and control of metabolic fluxes in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 566–575.
- Ghosh, T., Bose, D., and Zhang, X. (2010). Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol. Rev.* *34*, 611–627.
- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., and Riggs, A.D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 106–110.
- Gonzalez Chavez, R., Alvarez, A.F., Romeo, T., and Georgellis, D. (2010). The Physiological Stimulus for the BarA Sensor Kinase. *J. Bacteriol.* *192*, 2009–2012.
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W.B., Harrigan, G.G., and Kell, D.B. (2004). Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* *22*, 245–252.
- Görke, B., and Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 613–624.
- Górna, M.W., Carpousis, A.J., and Luisi, B.F. (2012). From conformational chaos to robust regulation: the structure and function of the multi-enzyme RNA degradosome. *Q. Rev. Biophys.* *45*, 105–145.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., and Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *63*, 141–155.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003). Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annu. Rev. Microbiol.* *57*, 441–466.

- Gualerzi, C.O., Giuliadori, A.M., and Pon, C.L. (2003). Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.* *331*, 527–539.
- Gudapaty, S., Suzuki, K., Wang, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Regulatory Interactions of Csr Components: the RNA Binding Protein CsrA Activates *csrB* Transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *183*, 6017–6027.
- Gudmundsson, S., and Thiele, I. (2010). Computationally efficient flux variability analysis. *BMC Bioinformatics* *11*, 489.
- Güell, M., Yus, E., Lluch-Senar, M., and Serrano, L. (2011). Bacterial transcriptomics: what is beyond the RNA hori-zome? *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 658–669.
- Gutierrez, P., Li, Y., Osborne, M.J., Pomerantseva, E., Liu, Q., and Gehring, K. (2005). Solution Structure of the Carbon Storage Regulator Protein CsrA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *187*, 3496–3501.
- Gutierrez-Ríos, R.M., Freyre-Gonzalez, J.A., Resendis, O., Collado-Vides, J., Saier, M., and Gosset, G. (2007). Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol.* *7*, 53.
- Hayashi, G., Hong, C., Hagihara, M., and Nakatani, K. (2012). Activation of prokaryotic translation by antisense oligonucleotides binding to coding region of mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *429*, 105–110.
- Hayes, C.S., and Sauer, R.T. (2003). Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol. Cell* *12*, 903–911.
- Heinemann, M., and Sauer, U. (2010). Systems biology of microbial metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 337–343.
- Hengge, R. (2009a). Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* *160*, 667–676.
- 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. MMBR* *66*, 373–395, table of contents.
- Henry, C.S., Jankowski, M.D., Broadbelt, L.J., and Hatzimanikatis, V. (2006). Genome-scale thermodynamic analysis of *Escherichia coli* metabolism. *Biophys. J.* *90*, 1453–1461.
- Henry, C.S., Broadbelt, L.J., and Hatzimanikatis, V. (2007). Thermodynamics-Based Metabolic Flux Analysis. *Biophys. J.* *92*, 1792–1805.
- Hermesen, R., Okano, H., You, C., Werner, N., and Hwa, T. (2015). A growth-rate composition formula for the growth of *E. coli* on co-utilized carbon substrates. *Mol. Syst. Biol.* *11*, n/a – n/a.
- Hirsch, M., and Elliott, T. (2002). Role of ppGpp in *rpoS* Stationary-Phase Regulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *184*, 5077–5087.
- Hoch, J.A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 165–170.

- Holms, H. (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* *19*, 85–116.
- van Houte, J., and Jansen, H.M. (1970). Role of glycogen in survival of *Streptococcus mitis*. *J. Bacteriol.* *101*, 1083–1085.
- Hunter IS, Kornberg HL. (1979). Glucose transport of *Escherichia coli* growing in glucose-limited continuous culture. *Biochem. J.* *178*, 97–101.
- Irani, M.H., and Maitra, P.K. (1977). Properties of *Escherichia coli* mutants deficient in enzymes of glycolysis. *J. Bacteriol.* *132*, 398–410.
- Ishihama, A. (1981). Subunit of assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Adv. Biophys.* *14*, 1–35.
- Ishihama, A. (2000). Functional Modulation of *Escherichia coli* Rna Polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 499–518.
- Jin, D.J., Cagliero, C., and Zhou, Y.N. (2012). Growth rate regulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 269–287.
- Jishage, M., and Ishihama, A. (1998). A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 4953–4958.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., and Nyström, T. (2002). Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* *16*, 1260–1270.
- Jonas, K., and Melefors, Ö. (2009). The *Escherichia coli* CsrB and CsrC small RNAs are strongly induced during growth in nutrient-poor medium. *FEMS Microbiol. Lett.* *297*, 80–86.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U., and Melefors, O. (2008). The RNA binding protein CsrA controls c-di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Mol. Microbiol.* *70*, 236–257.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Ahmad, I., Romeo, T., Römling, U., and Melefors, Ö. (2010). Complex regulatory network encompassing the Csr, c-di-GMP and motility systems of *Salmonella Typhimurium*. *Environ. Microbiol.* *12*, 524–540.
- Joyce, S.A., and Dreyfus, M. (1998). In the absence of translation, RNase E can bypass 5' mRNA stabilizers in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *282*, 241–254.
- Jørgensen, M.G., Thomason, M.K., Havelund, J., Valentin-Hansen, P., and Storz, G. (2013). Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. *Genes Dev.* *27*, 1132–1145.
- Kaberdin, V.R., and Bläsi, U. (2006). Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* *30*, 967–979.
- Kaczanowska, M., and Rydén-Aulin, M. (2007). Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* *71*, 477–494.
- Kadner, R.J., Murphy, G.P., and Stephens, C.M. (1992). Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* *138*, 2007–2014.

- Kameshita, I., Tokushige, M., Izui, K., and Katsuki, H. (1979). Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Affinity labeling with bromopyruvate. *J. Biochem. (Tokyo)* *86*, 1251–1257.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 123–140.
- Kauffman, K.J., Prakash, P., and Edwards, J.S. (2003). Advances in flux balance analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* *14*, 491–496.
- Keseler, I.M., Bonavides-Martínez, C., Collado-Vides, J., Gama-Castro, S., Gunsalus, R.P., Johnson, D.A., Krummenacker, M., Nolan, L.M., Paley, S., Paulsen, I.T., *et al.* (2009). EcoCyc: a comprehensive view of *Escherichia coli* biology. *Nucleic Acids Res.* *37*, D464–D470.
- Kimata, K., Tanaka, Y., Inada, T., and Aiba, H. (2001). Expression of the glucose transporter gene, *ptsG*, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *20*, 3587–3595.
- Kitano, H. (2002a). Systems biology: a brief overview. *Science* *295*, 1662–1664.
- Kitano, H. (2002b). Computational systems biology. *Nature* *420*, 206–210.
- Klein, A.H., Shulla, A., Reimann, S.A., Keating, D.H., and Wolfe, A.J. (2007). The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J. Bacteriol.* *189*, 5574–5581.
- Klumpp, S., and Hwa, T. (2008). Growth-rate-dependent partitioning of RNA polymerases in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20245–20250.
- Klumpp, S., Zhang, Z., and Hwa, T. (2009). Growth Rate-Dependent Global Effects on Gene Expression in Bacteria. *Cell* *139*, 1366–1375.
- Kochanowski, K., Volkmer, B., Gerosa, L., Haverkorn van Rijsewijk, B.R., Schmidt, A., and Heinemann, M. (2013). Functioning of a metabolic flux sensor in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 1130–1135.
- Kornberg, H.L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* *99*, 1–11.
- Kotte, O., Zaugg, J.B., and Heinemann, M. (2010). Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 355.
- Kotte, O., Volkmer, B., Radzikowski, J.L., and Heinemann, M. (2014). Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism. *Mol. Syst. Biol.* *10*, 736.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* *234*, 187–208.
- Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* *361*, 13–37.

- Kremling, A., Bettenbrock, K., Laube, B., Jahreis, K., Lengeler, J.W., and Gilles, E.D. (2001). The organization of metabolic reaction networks. III. Application for diauxic growth on glucose and lactose. *Metab. Eng.* 3, 362–379.
- Kremling, A., Geiselman, J., Ropers, D., and de Jong, H. (2014). Understanding carbon catabolite repression in *Escherichia coli* using quantitative models. *Trends Microbiol.*
- Kuhn, M.L., Zemaitaitis, B., Hu, L.I., Sahu, A., Sorensen, D., Minasov, G., Lima, B.P., Scholle, M., Mrksich, M., Anderson, W.F., *et al.* (2014). Structural, Kinetic and Proteomic Characterization of Acetyl Phosphate-Dependent Bacterial Protein Acetylation. *PLoS ONE* 9, e94816.
- Kuile, B.H. ter, and Westerhoff, H.V. (2001). Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway. *FEBS Lett.* 500, 169–171.
- Kumari, S., Tishel, R., Eisenbach, M., and Wolfe, A.J. (1995). Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 2878–2886.
- Kundig, W., Ghosh, S., and Roseman, S. (1964). Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52, 1067–1074.
- Kuzj, A.E., Medberry, P.S., and Schottel, J.L. (1998). Stationary phase, amino acid limitation and recovery from stationary phase modulate the stability and translation of chloramphenicol acetyltransferase mRNA and total mRNA in *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* 144 (Pt 3), 739–750.
- Kuzminov, A. (1999). Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 63, 751–813, table of contents.
- Lalaouna, D., Simoneau-Roy, M., Lafontaine, D., and Massé, E. (2013). Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1829, 742–747.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1994). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 8, 1600–1612.
- Laursen, B.S., Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., and Sperling-Petersen, H.U. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 69, 101–123.
- Lay, N.D., Schu, D.J., and Gottesman, S. (2013). Bacterial Small RNA-based Negative Regulation: Hfq and Its Accomplices. *J. Biol. Chem.* 288, 7996–8003.
- Lee, D., Smallbone, K., Dunn, W.B., Murabito, E., Winder, C.L., Kell, D.B., Mendes, P., and Swainston, N. (2012). Improving metabolic flux predictions using absolute gene expression data. *BMC Syst. Biol.* 6, 73.
- Lemke, J.J., Durfee, T., and Gourse, R.L. (2009). DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade. *Mol. Microbiol.* 74, 1368–1379.
- Lendenmann, U., Snozzi, M., and Egli, T. (1996). Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1493–1499.

- Lenz, G., Doron-Faigenboim, A., Ron, E.Z., Tuller, T., and Gophna, U. (2011). Sequence features of *E. coli* mRNAs affect their degradation. *PloS One* 6, e28544.
- Liang, S.-T., Bipatnath, M., Xu, Y.-C., Chen, S.-L., Dennis, P., Ehrenberg, M., and Bremer, H. (1999). Activities of constitutive promoters in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 292, 19–37.
- Lin, H.-H., Lin, C.-H., Hwang, S.-M., and Tseng, C.-P. (2012). High growth rate downregulates *fumA* mRNA transcription but is dramatically compensated by its mRNA stability in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 64, 412–417.
- Liu, M.Y., and Romeo, T. (1997). The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J. Bacteriol.* 179, 4639–4642.
- Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J., and Blattner, F.R. (2005). Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 280, 15921–15927.
- Liu, M.Y., Yang, H., and Romeo, T. (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* 177, 2663–2672.
- Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2002). Life and Death in a Macrophage: Role of the Glyoxylate Cycle in Virulence. *Eukaryot. Cell* 1, 657–662.
- Mackie, G.A. (2013). RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 45–57.
- Mahadevan, R., and Schilling, C.H. (2003). The effects of alternate optimal solutions in constraint-based genome-scale metabolic models. *Metab. Eng.* 5, 264–276.
- Mahadevan, R., Edwards, J.S., and Doyle, F.J. (2002). Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 83, 1331–1340.
- Maitra, A., and Dill, K.A. (2015). Bacterial growth laws reflect the evolutionary importance of energy efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 406–411.
- Maki, K., Morita, T., Otaka, H., and Aiba, H. (2010). A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of *ptsG* mRNA. *Mol. Microbiol.* 76, 782–792.
- El-Mansi, M. (2004). Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 295–300.
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M., and Gilad, Y. (2008). RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 18, 1509–1517.
- Marr, A.G., Nilson, E.H., and Clark, D.J. (1963). The Maintenance Requirement of *Escherichia Coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 536–548.
- Martínez, L.C., Martínez-Flores, I., Salgado, H., Fernández-Mora, M., Medina-Rivera, A., Puente, J.L., Collado-Vides, J., and Bustamante, V.H. (2014). In silico identification and experimental characterization of regulatory elements controlling the expression of the *Salmonella* *csrB* and *csrC* genes. *J. Bacteriol.* 196, 325–336.

- Martinez-Antonio, A. (2011). *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. *Netw. Biol.* *1*, 21–23.
- Martínez-Antonio, A., and Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 482–489.
- Mashego, M.R., Wu, L., Van Dam, J.C., Ras, C., Vinke, J.L., Van Winden, W.A., Van Gulik, W.M., and Heijnen, J.J. (2004). MIRACLE: mass isotopomer ratio analysis of U-¹³C-labeled extracts. A new method for accurate quantification of changes in concentrations of intracellular metabolites. *Biotechnol. Bioeng.* *85*, 620–628.
- Massé, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *17*, 2374–2383.
- McCleary, W.R., and Stock, J.B. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* *269*, 31567–31572.
- McCloskey, D., Palsson, B.?, and Feist, A.M. (2013). Basic and applied uses of genome-scale metabolic network reconstructions of *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* *9*, 661.
- McDonald TP, Walmsley AR, Henderson PJF. (1997). Asparagine 394 in putative helix 11 of the galactose-H₂O symport protein (GalP) from *Escherichia coli* is associated with the internal binding site for cytochalasin B and sugar. *J. Biol. Chem.* *272*, 15189–15199.
- McDowall, K.J., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1994). A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J. Biol. Chem.* *269*, 10790–10796.
- McGrew, S.B., and Mallette, M.F. (1962). Energy of maintenance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *83*, 844–850.
- McKee, A.E., Rutherford, B.J., Chivian, D.C., Baidoo, E.K., Juminaga, D., Kuo, D., Benke, P.I., Dietrich, J.A., Ma, S.M., Arkin, A.P., *et al.* (2012). Manipulation of the carbon storage regulator system for metabolite remodeling and biofuel production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* *11*, 79.
- McLeod, S.M., and Johnson, R.C. (2001). Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* *4*, 152–159.
- Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2006). Comprehensive Alanine-scanning Mutagenesis of *Escherichia coli* CsrA Defines Two Subdomains of Critical Functional Importance. *J. Biol. Chem.* *281*, 31832–31842.
- Mercante, J., Edwards, A.N., Dubey, A.K., Babitzke, P., and Romeo, T. (2009). Molecular Geometry of CsrA (RsmA) Binding to RNA and Its Implications for Regulated Expression. *J. Mol. Biol.* *392*, 511–528.
- Miller, T., and Churchill, B.W. (1986). Substrates for large-scale fermentations. In Demain AL, Solomon NA (eds), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (Washington DC), pp. 122–136.
- Milón, P., and Rodnina, M.V. (2012). Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *47*, 334–348.

- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M.V., Pon, C.L., Boelens, R., and Gualerzi, C.O. (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 13962–13967.
- Milon, P., Carotti, M., Konevega, A.L., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., and Gualerzi, C.O. (2010). The ribosome-bound initiation factor 2 recruits initiator tRNA to the 30S initiation complex. *EMBO Rep.* *11*, 312–316.
- Mogk, A., Schmidt, R., and Bukau, B. (2007). The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol.* *17*, 165–172.
- Monod, J. (1941). The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* *3*, 371–394.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., and Giannella, R.A. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* *41*, 1340–1351.
- Moons, P., Michiels, C.W., and Aertsen, A. (2009). Bacterial interactions in biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* *35*, 157–168.
- Morita, T., El-Kazzaz, W., Tanaka, Y., Inada, T., and Aiba, H. (2003). Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *278*, 15608–15614.
- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* *19*, 2176–2186.
- Muffler, A., Fischer, D., and Hengge-Aronis, R. (1996). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* *10*, 1143–1151.
- Nicastro, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2015). KH-RNA interactions: back in the groove. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *30*, 63–70.
- Nilsson, G., Belasco, J.G., Cohen, S.N., and von Gabain, A. (1984). Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* *312*, 75–77.
- Noor, E., Eden, E., Milo, R., and Alon, U. (2010). Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Mol. Cell* *39*, 809–820.
- Nudler, E., and Gottesman, M.E. (2002). Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* *7*, 755–768.
- Orth, J.D., Thiele, I., and Palsson, B.Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nat. Biotechnol.* *28*, 245–248.
- Orth, J.D., Conrad, T.M., Na, J., Lerman, J.A., Nam, H., Feist, A.M., and Palsson, B.Ø. (2011). A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism--2011. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 535.

- Österberg, S., del Peso-Santos, T., and Shingler, V. (2011). Regulation of Alternative Sigma Factor Use. *Annu. Rev. Microbiol.* *65*, 37–55.
- Paget, M. (2014). Prokaryotic Gene Regulation by Sigma Factors and RNA Polymerase. In *Molecular Life Sciences*, E. Bell, ed. (Springer New York), pp. 1–7.
- Pannuri, A., Yakhnin, H., Vakulskas, C.A., Edwards, A.N., Babitzke, P., and Romeo, T. (2012). Translational Repression of NhaR, a Novel Pathway for Multi-Tier Regulation of Biofilm Circuitry by CsrA. *J. Bacteriol.* *194*, 79–89.
- Papenfert, K., and Vogel, J. (2010). Regulatory RNA in Bacterial Pathogens. *Cell Host Microbe* *8*, 116–127.
- Papp, B., Pál, C., and Hurst, L.D. (2004). Metabolic network analysis of the causes and evolution of enzyme dispensability in yeast. *Nature* *429*, 661–664.
- Park, Y.-H., Lee, B.R., Seok, Y.-J., and Peterkofsky, A. (2006). In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *281*, 6448–6454.
- Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1993). The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annu. Rev. Genet.* *27*, 437–496.
- Passalacqua, K.D., Varadarajan, A., Ondov, B.D., Okou, D.T., Zwick, M.E., and Bergman, N.H. (2009). Structure and Complexity of a Bacterial Transcriptome. *J. Bacteriol.* *191*, 3203–3211.
- Patterson-Fortin, L.M., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Babitzke, P., and Romeo, T. (2013). Dual Posttranscriptional Regulation via a Cofactor-Responsive mRNA Leader. *J. Mol. Biol.* *425*, 3662–3677.
- Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., and Gourse, R.L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* *118*, 311–322.
- Paul, B.J., Berkmen, M.B., and Gourse, R.L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7823–7828.
- Pérez-Rueda, E., and Collado-Vides, J. (2000). The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1838–1847.
- Pernestig, A.-K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., and Melefors, Ö. (2003). The *Escherichia coli* BarA-UvrY Two-Component System Is Needed for Efficient Switching between Glycolytic and Gluconeogenic Carbon Sources. *J. Bacteriol.* *185*, 843–853.
- Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., and Georgellis, D. (2001). Identification of UvrY as the Cognate Response Regulator for the BarA Sensor Kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *276*, 225–231.
- Peskov, K., Mogilevskaya, E., and Demin, O. (2012). Kinetic modelling of central carbon metabolism in *Escherichia coli*. *FEBS J.* *279*, 3374–3385.
- Peterson, C.N., Mandel, M.J., and Silhavy, T.J. (2005). *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. *J. Bacteriol.* *187*, 7549–7553.

- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., and Vogel, J. (2009). Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 840–846.
- Picard, F., Dressaire, C., Girbal, L., and Coccagn-Bousquet, M. (2009). Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology. *C. R. Biol.* *332*, 958–973.
- Piper, S.E., Mitchell, J.E., Lee, D.J., and Busby, S.J.W. (2009). A global view of Escherichia coli Rsd protein and its interactions. *Mol. Biosyst.* *5*, 1943–1947.
- Podgornaia, A.I., and Laub, M.T. (2013). Determinants of specificity in two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* *16*, 156–162.
- Preiss, J. (1984). Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* *38*, 419–458.
- Price, N.D., Reed, J.L., and Palsson, B.Ø. (2004). Genome-scale models of microbial cells: evaluating the consequences of constraints. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 886–897.
- Pruss, G.J., and Drlica, K. (1989). DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* *56*, 521–523.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994). A protein complex mediating mRNA degradation in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* *14*, 717–729.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996). A DEAD-box RNA helicase in the Escherichia coli RNA degradosome. *Nature* *381*, 169–172.
- Raman, K., and Chandra, N. (2009). Flux balance analysis of biological systems: applications and challenges. *Brief. Bioinform.* *10*, 435–449.
- Ramseier, T.M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R., and Saier, M.H. (1995). The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* *16*, 1157–1169.
- Rauhut, R., and Klug, G. (1999). mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* *23*, 353–370.
- Reaves, M.L., and Rabinowitz, J.D. (2011). Metabolomics in systems microbiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 17–25.
- Redon, E., Loubière, P., and Coccagn-Bousquet, M. (2005). Role of mRNA stability during genome-wide adaptation of Lactococcus lactis to carbon starvation. *J. Biol. Chem.* *280*, 36380–36385.
- Reed, J.L., Patel, T.R., Chen, K.H., Joyce, A.R., Applebee, M.K., Herring, C.D., Bui, O.T., Knight, E.M., Fong, S.S., and Palsson, B.O. (2006). Systems approach to refining genome annotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17480–17484.
- Reed, L.J., Pettit, F.H., Eley, M.H., Hamilton, L., Collins, J.H., and Oliver, R.M. (1975). Reconstitution of the Escherichia coli pyruvate dehydrogenase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 3068–3072.
- Repoila, F., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2003). Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in Escherichia coli: the RpoS paradigm. *Mol. Microbiol.* *48*, 855–861.

- Revelles, O., Millard, P., Nougayrède, J.-P., Dobrindt, U., Oswald, E., Létisse, F., and Portais, J.-C. (2013). The carbon storage regulator (Csr) system exerts a nutrient-specific control over central metabolism in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *PLoS One* *8*, e66386.
- Ribbons, D.W., and Dawes, E.A. (1963). Environmental and growth conditions affecting the endogenous metabolism of bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *102*, 564–586.
- Rice, J.B., Balasubramanian, D., and Vanderpool, C.K. (2012). Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2691–E2698.
- Richards, G.R., Patel, M.V., Lloyd, C.R., and Vanderpool, C.K. (2013). Depletion of glycolytic intermediates plays a key role in glucose-phosphate stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *195*, 4816–4825.
- Roberts, J.W. (2009). Promoter-specific control of *E. coli* RNA polymerase by ppGpp and a general transcription factor. *Genes Dev.* *23*, 143–146.
- Robillard, G.T., and Broos, J. (1999). Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* *1422*, 73–104.
- Roche, E.D., and Sauer, R.T. (1999). SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J.* *18*, 4579–4589.
- Romeo, T. (1998). Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol. Microbiol.* *29*, 1321–1330.
- Romeo, T., and Gong, M. (1993). Genetic and physical mapping of the regulatory gene *csrA* on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J. Bacteriol.* *175*, 5740–5741.
- Romeo, T., Kumar, A., and Preiss, J. (1988). Analysis of the *Escherichia coli* glycogen gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic genes. *Gene* *70*, 363–376.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J. Bacteriol.* *175*, 4744–4755.
- Romeo, T., Vakulskas, C.A., and Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environ. Microbiol.* *15*, 313–324.
- Rossell, S., van der Weijden, C.C., Kruckeberg, A.L., Bakker, B.M., and Westerhoff, H.V. (2005). Hierarchical and metabolic regulation of glucose influx in starved *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* *5*, 611–619.
- Sabnis, N.A., Yang, H., and Romeo, T. (1995). Pleiotropic Regulation of Central Carbohydrate Metabolism in *Escherichia coli* via the Gene *csrA*. *J. Biol. Chem.* *270*, 29096–29104.
- Saier, M.H. (1996). Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Res. Microbiol.* *147*, 439–447.

- Saier, M.H., and Ramseier, T.M. (1996). The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* *178*, 3411–3417.
- Salvail, H., Caron, M.-P., Bélanger, J., and Massé, E. (2013). Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin. *EMBO J.* *32*, 2764–2778.
- Sauer, E. (2013). Special Focus Hfq. *RNA Biol.* *10*, 590–591.
- Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., *et al.* (2004). Sculpting the Proteome with AAA+ Proteases and Disassembly Machines. *Cell* *119*, 9–18.
- Sauer, U., Lasko, D.R., Fiaux, J., Hochuli, M., Glaser, R., Szyperski, T., Wüthrich, K., and Bailey, J.E. (1999). Metabolic Flux Ratio Analysis of Genetic and Environmental Modulations of *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism. *J. Bacteriol.* *181*, 6679–6688.
- Schaechter, M., Maaløe, O., and Kjeldgaard, N.O. (1958). Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* *19*, 592–606.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* *270*, 467–470.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., and Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* *187*, 4774–4781.
- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F.C., Jelesarov, I., Haas, D., and Allain, F.H.-T. (2007). Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 807–813.
- Scott, M., and Hwa, T. (2011). Bacterial growth laws and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 559–565.
- Segrè, D., Vitkup, D., and Church, G.M. (2002). Analysis of optimality in natural and perturbed metabolic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15112–15117.
- Selinger, D.W., Cheung, K.J., Mei, R., Johansson, E.M., Richmond, C.S., Blattner, F.R., Lockhart, D.J., and Church, G.M. (2000). RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat. Biotechnol.* *18*, 1262–1268.
- Selinger, D.W., Saxena, R.M., Cheung, K.J., Church, G.M., and Rosenow, C. (2003). Global RNA Half-Life Analysis in *Escherichia coli* Reveals Positional Patterns of Transcript Degradation. *Genome Res.* *13*, 216–223.
- Serganov, A., and Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell* *152*, 17–24.
- Seyll, E., and Van Melderen, L. (2013). The Ribonucleoprotein Csr Network. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 22117–22131.

- Shalem, O., Dahan, O., Levo, M., Martinez, M.R., Furman, I., Segal, E., and Pilpel, Y. (2008). Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Mol. Syst. Biol.* *4*, 223.
- Shimamoto, N., Kamigochi, T., and Utiyama, H. (1986). Release of the sigma subunit of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase depends mainly on time elapsed after the start of initiation, not on length of product RNA. *J. Biol. Chem.* *261*, 11859–11865.
- Shinar, G., Rabinowitz, J.D., and Alon, U. (2009). Robustness in Glyoxylate Bypass Regulation. *PLoS Comput Biol* *5*, e1000297.
- Siebold, C., Flükiger, K., Beutler, R., and Erni, B. (2001). Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett.* *504*, 104–111.
- Siegel, M.L. (2015). Shifting Sugars and Shifting Paradigms. *PLoS Biol* *13*, e1002068.
- Skoog, D., West, D., Holler, F., and Crouch, S. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (Cengage Learning).
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., and Yan, X. (2010). Eavesdropping by Bacteria: The Role of SdiA in Escherichia coli and Salmonella enterica Serovar Typhimurium Quorum Sensing. *Foodborne Pathog. Dis.* *8*, 169–178.
- Solopova, A., van Gestel, J., Weissing, F.J., Bachmann, H., Teusink, B., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2014). Bet-hedging during bacterial diauxic shift. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 7427–7432.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., and Hengge, R. (2009). Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in Escherichia coli. *Microbiology* *155*, 1318–1331.
- Spurgeon, S.L., Jones, R.C., and Ramakrishnan, R. (2008). High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS One* *3*, e1662.
- Srivatsan, A., and Wang, J.D. (2008). Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* *11*, 100–105.
- Stanier, R.Y. (1951). Enzymatic adaptation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *5*, 35–56.
- Stelling, J. (2004). Mathematical models in microbial systems biology. *Curr. Opin. Microbiol.* *7*, 513–518.
- Strange, R.E. (1968). Bacterial “glycogen” and survival. *Nature* *220*, 606–607.
- Sun, Y., and Vanderpool, C.K. (2013). Physiological consequences of multiple-target regulation by the small RNA SgrS in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* *195*, 4804–4815.
- Sunohara, T., Jojima, K., Tagami, H., Inada, T., and Aiba, H. (2004). Ribosome stalling during translation elongation induces cleavage of mRNA being translated in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* *279*, 15368–15375.

- Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A.-K., Melefors, Ö., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2002). Regulatory Circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY Systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *184*, 5130–5140.
- Suzuki, K., Babitzke, P., Kushner, S.R., and Romeo, T. (2006). Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E. *Genes Dev.* *20*, 2605–2617.
- Tanaka, Y., Itoh, F., Kimata, K., and Aiba, H. (2004). Membrane localization itself but not binding to IICB is directly responsible for the inactivation of the global repressor Mlc in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *53*, 941–951.
- Takayama, K., and Kjelleberg, S. (2000). The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environ. Microbiol.* *2*, 355–365.
- Taymaz-Nikerel, H., de Mey, M., Ras, C., Pierick, A. ten, Seifar, R.M., van Dam, J.C., Heijnen, J.J., and van Gulik, W.M. (2009). Development and application of a differential method for reliable metabolome analysis in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* *386*, 9–19.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., and Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 207–217.
- Thiele, I., Fleming, R.M.T., Bordbar, A., Schellenberger, J., and Palsson, B.Ø. (2010). Functional characterization of alternate optimal solutions of *Escherichia coli*'s transcriptional and translational machinery. *Biophys. J.* *98*, 2072–2081.
- Thiele, I., Fleming, R.M.T., Que, R., Bordbar, A., Diep, D., and Palsson, B.O. (2012). Multiscale modeling of metabolism and macromolecular synthesis in *E. coli* and its application to the evolution of codon usage. *PLoS One* *7*, e45635.
- Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, Storz G. (2012). A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* *84*, 17–35.
- Timmermans, J., and Melderer, L.V. (2009). Conditional Essentiality of the *csrA* Gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *191*, 1722–1724.
- Timmermans, J., and Melderer, L.V. (2010). Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 2897–2908.
- Tomenius, H., Pernestig, A.-K., Méndez-Catalá, C.F., Georgellis, D., Normark, S., and Melefors, O. (2005). Genetic and functional characterization of the *Escherichia coli* BarA-UvrY two-component system: point mutations in the HAMP linker of the BarA sensor give a dominant-negative phenotype. *J. Bacteriol.* *187*, 7317–7324.
- Traxler, M.F., Chang, D.-E., and Conway, T. (2006). Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2374–2379.
- Traxler, M.F., Zacharia, V.M., Marquardt, S., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Stark, S.E., and Conway, T. (2011). Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the “feast to famine” gradient in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *79*, 830–845.

- Treviño-Quintanilla, L.G., Freyre-González, J.A., and Martínez-Flores, I. (2013). Anti-Sigma Factors in *E. coli*: Common Regulatory Mechanisms Controlling Sigma Factors Availability. *Curr. Genomics* 14, 378–387.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.
- Umitsuki, G., Wachi, M., Takada, A., Hikichi, T., and Nagai, K. (2001). Involvement of RNase G in in vivo mRNA metabolism in *Escherichia coli*. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 6, 403–410.
- Usuda, Y., Nishio, Y., Iwatani, S., Van Dien, S.J., Imaizumi, A., Shimbo, K., Kageyama, N., Iwahata, D., Miyano, H., and Matsui, K. (2010). Dynamic modeling of *Escherichia coli* metabolic and regulatory systems for amino-acid production. *J. Biotechnol.* 147, 17–30.
- Vakulskas, C.A., Pannuri, A., Cortés-Selva, D., Zere, T.R., Ahmer, B.M., Babitzke, P., and Romeo, T. (2014). Global effects of the DEAD-box RNA helicase *DeaD* (*CsdA*) on gene expression over a broad range of temperatures. *Mol. Microbiol.* 92, 945–958.
- Vakulskas, C.A., Potts, A.H., Babitzke, P., Ahmer, B.M.M., and Romeo, T. (2015). Regulation of Bacterial Virulence by *Csr* (*Rsm*) Systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 79, 193–224.
- Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J.* 275, 2712–2726.
- Varma, A., and Palsson, B.O. (1994). *Metabolic Flux Balancing: Basic Concepts, Scientific and Practical Use*. *Bio/Technology* 12.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12142–12149.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Hieter, P., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 88, 243–251.
- Visca, P., Leoni, L., Wilson, M.J., and Lamont, I.L. (2002). Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* 45, 1177–1190.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2004). Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet. TIG* 20, 44–50.
- Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011). Hfq and its constellation of RNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 578–589.
- Volkmer, B., and Heinemann, M. (2011). Condition-Dependent Cell Volume and Concentration of *Escherichia coli* to Facilitate Data Conversion for Systems Biology Modeling. *PLoS ONE* 6, e23126.
- Vytvytska, O., Jakobsen, J.S., Balcunaite, G., Andersen, J.S., Baccarini, M., and von Gabain, A. (1998). Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli* *ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14118–14123.
- Wada, A. (1998). Growth phase coupled modulation of *Escherichia coli* ribosomes. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 3, 203–208.

- Wang, L., and Wise, M.J. (2011). Glycogen with short average chain length enhances bacterial durability. *Naturwissenschaften* *98*, 719–729.
- Wang, X., Preston, J.F., and Romeo, T. (2004). The pgaABCD Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* *186*, 2724–2734.
- Wang, X., Dubey, A.K., Suzuki, K., Baker, C.S., Babitzke, P., and Romeo, T. (2005). CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *56*, 1648–1663.
- Wassarman, K.M., and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell* *101*, 613–623.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *21*, 319–346.
- Wei, B., Shin, S., LaPorte, D., Wolfe, A.J., and Romeo, T. (2000). Global Regulatory Mutations in *csrA* and *rpoS* Cause Severe Central Carbon Stress in *Escherichia coli* in the Presence of Acetate. *J. Bacteriol.* *182*, 1632–1640.
- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.-M., Simecka, J.W., Prüß, B.M., Babitzke, P., and Romeo, T. (2001). Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *40*, 245–256.
- Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A.K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C.S., Georgellis, D., Babitzke, P., and Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *48*, 657–670.
- van der Werf, M.J., Overkamp, K.M., Mulwijk, B., Coulier, L., and Hankemeier, T. (2007). Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolome coverage. *Anal. Biochem.* *370*, 17–25.
- Wolfe, A.J. (2005). The Acetate Switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *69*, 12–50.
- Wösten, M.M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* *22*, 127–150.
- Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Vakulskas, C.A., Yakhnin, H., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2013). CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol. Microbiol.* *87*, 851–866.
- Yakhnin, H., Baker, C.S., Berezin, I., Evangelista, M.A., Rassin, A., Romeo, T., and Babitzke, P. (2011a). CsrA Represses Translation of *sdiA*, Which Encodes the N-Acylhomoserine-Lactone Receptor of *Escherichia coli*, by Binding Exclusively within the Coding Region of *sdiA* mRNA. *J. Bacteriol.* *193*, 6162–6170.
- Yakhnin, H., Yakhnin, A.V., Baker, C.S., Sineva, E., Berezin, I., Romeo, T., and Babitzke, P. (2011b). Complex regulation of the global regulatory gene *csrA*: CsrA-mediated translational repression, transcription from five promoters by E⁷⁰ and E^S, and indirect transcriptional activation by CsrA. *Mol. Microbiol.* *81*, 689–704.
- Yang, H., Liu, M.Y., and Romeo, T. (1996). Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J. Bacteriol.* *178*, 1012–1017.

- Yoon, S.H., Han, M.-J., Jeong, H., Lee, C.H., Xia, X.-X., Lee, D.-H., Shim, J.H., Lee, S.Y., Oh, T.K., and Kim, J.F. (2012). Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12. *Genome Biol.* *13*, R37.
- Yoshida, H., Yamamoto, H., Uchiumi, T., and Wada, A. (2004). RMF inactivates ribosomes by covering the peptidyl transferase centre and entrance of peptide exit tunnel. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *9*, 271–278.
- Yusupova, G., and Yusupov, M. (2015). Ribosome biochemistry in crystal structure determination. *RNA* *21*, 771–773.
- Zaid Siddiquee, K. Al, Arauzo-Bravo, M.J., and Shimizu, K. (2004). Metabolic flux analysis of *pykF* gene knockout *Escherichia coli* based on ¹³C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *63*, 407–417.
- Zamboni, N., and Sauer, U. (2009). Novel biological insights through metabolomics and ¹³C-flux analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 553–558.
- Zheng, R.L., and Kemp, R.G. (1992). The mechanism of ATP inhibition of wild-type and mutant phosphofructo-1-kinase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *267*, 23640–23645.
- Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J.L., and Minchin, S.D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* *32*, 5874–5893.
- Zhou, D., and Yang, R. (2006). Global analysis of gene transcription regulation in prokaryotes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *63*, 2260–2290.
- Zhou, Y., Vazquez, A., Wise, A., Warita, T., Warita, K., Bar-Joseph, Z., and Oltvai, Z.N. (2013). Carbon catabolite repression correlates with the maintenance of near invariant molecular crowding in proliferating *E. coli* cells. *BMC Syst. Biol.* *7*, 138.
- Zubay, G., Schwartz, D., and Beckwith, J. (1970). Mechanism of Activation of Catabolite-Sensitive Genes: A Positive Control System*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *66*, 104–110.
- Zuo, Y., and Deutscher, M.P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* *29*, 1017–1026.

PUBLICATIONS
&
COMMUNICATIONS

Manuscrits en préparation:

- **Morin M.**, Laguerre S., Letisse F., Portias J.C., Ropers D., Coccagn-Bousquet M., and Enjalbert B. The CSR system controls the balance of metabolic pools in upper glycolysis of *Escherichia coli*
- **Morin M.**, Belluati A., Staes A., Fontana A., Mondeil S., Portais J.C., Coccagn-Bousquet M., and Enjalbert B. The CSR system controls *Escherichia coli* energetic levels after the glucose-acetate transition through glycogen accumulation.
- **Morin M.**, Mondeil S., Enjalbert B., Girbal L., and Coccagn-Bousquet M. Global analysis of gene expression during a metabolic transition reveals an unsuspected role of degradational control in bacterial adaptation.

Communications orales:

Flash présentation:

- **Morin M.**, Laguerre S., Enjalbert B., Coccagn-Bousquet M., and Ropers D. (2014). An integrative approach to determine the involvement of the post-transcriptional regulatory system CSR in the regulation of the central carbon metabolism in *Escherichia coli*. Bioinformatics/Biostatistics regional workshop, June 2014 - Toulouse, FR

Séminaire:

- **Morin M.** (2015). Function of the post-transcriptional regulator system CSR during a metabolic transition of the model bacterium *Escherichia coli*. Séminaire du LISBP, April 2015 – Toulouse, FR

Posters:

- **Morin M.**, Laguerre S., Enjalbert B., Coccagn-Bousquet M., and Ropers D. An integrative approach to determine the involvement of the post-transcriptional regulatory system CSR in the regulation of the central carbon metabolism in *Escherichia coli*. Bioinformatics/Biostatistics regional workshop - Toulouse, FR
- **Morin M.**, Laguerre S., Létisse F., Portais J.C., Ropers D., Coccagn-Bousquet M., & Enjalbert B. Attenuation of the post-transcriptional regulator CsrA activity results in a strong G6P stress impairing the growth of *Escherichia coli* on glucose. BioSyncSys Conferences – Toulouse, FR
- **Morin M.**, Ropers D., Létisse F., Portais J.C., Coccagn-Bousquet M. and Enjalbert B. . 2015. The post-transcriptional regulatory system CSR controls the balance of metabolic pools in upper glycolysis of *Escherichia coli*. European Science Foundation, Conference on Bacterial Network BacNet15. 09-15 May. Sant Feliu de Guíxols. Spain.
- **Morin M.**, Ropers D., Létisse F., Portais J.C., Enjalbert B., and Coccagn-Bousquet M. 2015. Role of the CSR System in the Multi-Leveled Control of the Central Carbon Metabolism in *Escherichia coli*. 115th General Meeting of the American Society for Microbiology. May 30-June 2. New Orleans, Louisiana. USA.

Rôle du régulateur post-transcriptionnel CSR dans l'adaptation métabolique de la bactérie modèle *Escherichia coli*

Dans son environnement, la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) fait face à d'importantes fluctuations des ressources carbonées. Une capacité d'adaptation métabolique lui permet de coloniser ou de subsister en fonction des substrats disponibles. Cette adaptation est régie par un réseau complexe de régulations de l'expression génique. Le régulateur global post-transcriptionnel CSR (Carbon Storage Regulator) régule la stabilité et/ou l'initiation de la traduction d'ARNm par l'intermédiaire de la protéine CsrA. Ce système, essentiel en présence de glucose et est également supposé être impliqué dans la régulation d'une transition métabolique glycolyse vers gluconéogenèse. Le caractère essentiel de CSR est à ce jour inexploré, tout comme son implication dans la régulation d'une adaptation métabolique. Une approche de biologie intégrative menée pour différents mutants du système CSR a permis d'avancer pour la première fois, une explication de l'essentialité de CSR lors d'une croissance exponentielle sur glucose et de caractériser son implication dans la régulation de la transition métabolique glucose-acétate. Des approches de transcriptomique et de stabilomique utilisées pour une souche sauvage au cours d'une adaptation métabolique ont mis en évidence l'importance des régulations de la stabilité des ARNm au cours de l'adaptation. En conclusion, ces travaux approfondissent grandement les connaissances concernant le système CSR et son implication dans la régulation du métabolisme d'*E. coli*. Ce système, indispensable à la régulation du métabolisme durant une phase de croissance sur glucose s'ajoute de façon indéniable au réseau déjà complexe de régulations du métabolisme d'*E. coli*.

Function of the post-transcriptional regulator CSR during the metabolic adaptation of the model bacteria *Escherichia coli*

In its natural environment, *Escherichia coli* (*E. coli*) faces strong fluctuations of the nutrient availability. A complex gene regulatory network makes the bacterium able to switch between a state of growth in the presence of an appropriate carbon source and a non-growth state in its absence. Within this network, the global post-transcriptional regulator CSR (Carbon Storage Regulator) modifies mRNA stability and/or translation initiation by the CsrA protein. This system has been shown to be essential for cells to grow on glucose and is hypothesized to be involved in the regulation of metabolic transitions. However both observations remained unexplored so far. An integrative approach has been used to investigate for the first time the essentiality of CSR on glucose as well as its involvement in the regulation of the glucose-acetate transition. Molecular and phenotypic data for different mutants of the CSR system have been produced and integrated into mathematical models. Transcriptomic and Stabilomic approaches have been used eventually to characterize the importance of the control of mRNA stability during the metabolic adaptation. mRNA stability regulations appear to be of particular importance in gene expression regulation during metabolic adaptation. To conclude, this work shed a new light upon CSR's involvement in the regulation of *E. coli*'s metabolism. CSR is definitely essential to regulate glycolysis and thus constitutes another regulator to be integrated into the already complex regulations network of *E. coli*'s metabolism.