



Adaptive metabolic mechanisms to nutritional and genetic constraints in *Escherichia coli*

Mickael Dinclaux

► To cite this version:

Mickael Dinclaux. Adaptive metabolic mechanisms to nutritional and genetic constraints in *Escherichia coli*. Genetics. INSA de Toulouse, 2022. English. NNT : 2022ISAT0033 . tel-04002570

HAL Id: tel-04002570

<https://theses.hal.science/tel-04002570>

Submitted on 23 Feb 2023

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.



THÈSE

**En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**
**Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de
Toulouse**

**Présentée et soutenue par
Mickael DINCLAUX**

Le 25 octobre 2022

**Mécanismes métaboliques adaptatifs aux contraintes
nutritionnelles et génétiques chez Escherichia coli**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche :

TBI - Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Thèse dirigée par
Fabien LETISSE

Jury

Mme Sophie COLOMBIÉ, Rapporteuse
M. Johannes Hans GEISELMANN, Rapporteur
M. Fabien LETISSE, Directeur de thèse
Mme Muriel COCAIGN-BOUSQUET, Présidente

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Sophie Colombié, Muriel Cocaign-Bousquet et Hans Geiselman d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et d'avoir évalué ce travail.

Je tiens aussi à remercier Fabien Letisse, mon directeur de thèse pour m'avoir accompagné durant toutes ces années. Trois ans de thèse, trois de débats scientifiques sur les avancées obtenues sur six projets différents (on ne comptera pas le formate...). C'est aussi presque 10 ans de collaboration. Tu m'as appris les bases de la microbiologie et de la métabolomique en stage de Master, et, depuis, les sujets de recherche se sont enchaînés en Master 2, puis en tant qu'ingénieur le temps de trouver des financements pour faire une thèse, pour finalement aboutir à cette dernière. En arrivant dans l'équipe, je n'avais pas encore de vision précise sur mon avenir, mais, durant toutes ces années, j'ai pris goût à la recherche et à la métabolomique. Merci aussi de m'avoir laissé toute la liberté scientifique et expérimentale dont j'avais besoin. Je te remercie encore d'avoir eu confiance en moi toutes ces années.

Un grand MERCI aussi à MetaSys et MetaToul. Deux entités qui, pour moi, ont toujours été qu'une seule et même grande famille. Merci Stéphanie, Florence, Brice, Sandrine, Pierre, Clément, Pietro, Alessandro, Jean Charles, Lindsay,

Floriant, Hanna, Cécilia, Edern, Lara, Mathieu, Claudia, Noémie, Baudoin Maud, Guy et les pépins : Camille et Neil. Je pense que durant toutes ses années je vous ai fait goûter toutes les recettes possibles de mousses au chocolat ! Chaque moment passé avec vous au labo et dans les jeudis Dubli a été exceptionnel. Edern et Lindsay, merci pour votre patience en RMN. Mon chat noir a mis à rude épreuve le 800 et vos nerfs! Pierre, merci pour toute ton aide. La majorité de mes connaissances en R et Python proviennent de tes conseils. Cécilia, Maud, vos chamailleries et discussions sur absolument tout vont me manquer.

Pour finir, je tiens aussi à remercier tous mes amis et ma famille qui m'ont soutenu durant toute cette période, en particulier ma femme qui, en plus d'avoir participé à de nombreuses relectures de ce manuscrit, m'a offert les deux plus beaux cadeaux : mes enfants, Quentin et Emmy. Emeline, je t'aime.

Résumé

Les micro-organismes, tels que les bactéries, possèdent d'importantes capacités à moduler leur métabolisme pour répondre à des perturbations environnementales physico-chimiques (température, pH, O₂, etc.) et/ou nutritionnelles (carbone, azote, oligoéléments, etc.), mais également à des modifications naturelles (évolution, acquisition transversale de gènes, mutation spontanée, etc.) ou synthétiques (ingénierie métabolique) de leur génome. Comprendre ces mécanismes d'adaptation est fondamental pour appréhender les interactions complexes qu'il existe entre les micro-organismes au sein des consortia, entre les micro-organismes et leur niche écologique, ou bien optimiser la production industrielle de molécules à haute valeur ajoutée en biotechnologie.

Au cours de ce travail de thèse, le métabolisme de la bactérie *Escherichia coli* K-12 MG1655 a fait l'objet d'une étude approfondie visant à mieux comprendre comment celui-ci permet à la bactérie de s'adapter à différentes contraintes. La première est nutritionnelle. En présence de plusieurs sources de carbone (glucose et acétate), il a été mis en évidence une consommation simultanée de ces deux sources de carbone lors d'une croissance exponentielle sur un excès de glucose, contrairement à ce qui est généralement considéré pour ce microorganisme. Les données obtenues montrent aussi que la voie Pta-AckA seule est capable de soutenir à la fois la production et la consommation d'acétate en cas d'excès de glucose. La carence en fer, un oligoélément essentiel pour la bactérie a aussi été étudiée et comparée au taxon « B2 » qui regroupe des *E. coli* dites commensales mais aussi

pathogènes. Les résultats démontrent une grande disparité entre les souches K12 et B2 ; ces dernières résistant mieux à des carences en fer. Une similitude métabolique a pu être observée puisque les premières enzymes métaboliques impactées sont localisées dans la voie des acides aminés branchés.

Enfin, une contrainte métabolique résultant d'une mutation génétique localisée dans le gène *ilvG* des souches *E. coli* K-12 MG1655 a été étudiée. Il s'agit d'un gène codant pour une enzyme de voies métaboliques complexes et centrales pour la biosynthèse des acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine). Ces derniers représentent 20% de la composition des protéines en acides aminés. Cette étude s'est appuyée sur des approches quantitatives de métabolomique et de fluxomique pour l'analyse fonctionnelle des réseaux métaboliques basées essentiellement sur la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Des méthodologies de RMN dédiées à ce type d'approches ont été développées au cours de ce travail de thèse. L'ensemble des résultats obtenus sur ce volet a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le fonctionnement de la voie des acides aminés branchés en particulier, et sur les mécanismes de sa régulation. Décrite comme dépendante des concentrations en valine, leucine et isoleucine, sa régulation est en fait bien plus complexe. D'autres mécanismes de contrôle métabolique, mis en évidence au cours de la thèse (excrétion du propionate, activité promiscuitaire des AHAS) contribuent également au maintien de l'homéostasie dans cette partie du métabolisme.

Abstract

Microorganisms, such as bacteria, possess important capacities to modulate their metabolism in response to physicochemical (temperature, pH, O₂, etc.) and nutritional (carbon, nitrogen, trace elements, etc.) environmental perturbations, and/or to natural (evolution, spontaneous mutation, etc.) or synthetic (metabolic engineering) modifications of their genome. Understanding these adaptation mechanisms is of paramount importance to understand the complex interactions that exist between microorganisms within consortia, between microorganisms and their ecological niche, or to optimize the industrial production of high value-added molecules in biotechnology.

During this thesis, the metabolism of *Escherichia coli* K-12 MG1655 was studied in depth in order to better understand how it allows the bacterium to adapt to different constraints. The first one is nutritional. In the presence of several carbon sources (glucose and acetate), it was possible to observe simultaneous consumption of these two carbon sources during an exponential growth despite the presence of glucose, in contrast to what is generally considered for this microorganism. The data obtained also show that the Pta-AckA pathway alone is able to sustain both acetate production and consumption in the presence of excess glucose. Iron deficiency, an essential trace element for the bacteria, was also studied and compared to the B2 taxonomic clade that gathers commensal and pathogenic *E. coli* strains. The results show a great disparity between the K12 and B2 strains, the latter being more resistant to iron deficiency. However, a similarity could be noted at the metabolic level since the

first enzymes impacted by iron starvation are located in the branched-chain amino acid pathway.

Finally, a metabolic constraint originating from genetic mutation in *ilvG* gene of *E. coli* K-12 MG1655 strains was studied. This gene encodes for an enzyme involved in complex and central metabolic pathway for the biosynthesis of branched-chain amino acids (valine, leucine and isoleucine). The latter represent 20% of the protein composition in amino acids. This work was carried out by using quantitative metabolomics and fluxomics approaches for the functional analysis of metabolic networks relying mainly on mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (RMN). NMR-based methodologies aiming to better decipher metabolic pathway functioning, have been developed during the thesis. The results obtained have provided better understanding of branched-chain amino acid pathway functioning and more specifically, of mechanisms of its regulation. Described as dependent on valine, leucine and isoleucine intracellular concentrations, its regulation appears to be much more complex since other metabolic control mechanisms (propionate excretion, promiscuity activity of AHAS) also contribute to the maintenance of homeostasis in this part of the metabolism.

Sommaire

Table des illustrations.....	15
Index des tableaux	19
Abréviations.....	21
Introduction générale.....	25
1. Etude bibliographique.....	29
1.1. Escherichia coli.....	29
• Le genre <i>Escherichia</i>	29
• La phylogénie du genre <i>Escherichia</i>	30
1.2. Le groupe phylogénétique K-12 : un modèle d'étude.....	32
• Origine du groupe phylogénétique K-12.....	32
• <i>E. coli</i> au laboratoire	32
1.3. Régulation du métabolisme carboné chez E. coli.....	35
• Transition glucose/acétate	35
• La voie des acides aminés branchés	39
• La thréonine désaminase	42
• Une topologie atypique.....	43
1.4. Une voie étroitement liée au métabolisme du fer :	55
• Captation du fer	58
• Assimilation des complexes sidérophore/fer et stockage	64
• Utilisation du fer intracellulaire : Les protéines fer-soufre dans le métabolisme central carboné	67
• La voie des BCAA : un maillon qui relie métabolisme du fer et métabolisme carboné chez <i>E. coli</i> ?	69

1.5.	Objectifs de la thèse	69
2.	<i>Développement méthodologique</i>	79
2.1.	Méthodes d'analyse du marquage isotopique	80
2.2.	Evaluation de la séquence PSYCHE dans le cadre d'analyses isotopiques.....	82
2.3.	Approches alternatives pour augmenter les débits d'analyses isotopiques.....	84
2.4.	Improved Isotopic Profiling by Pure Shift Heteronuclear 2D J-Resolved NMR Spectroscopy	87
2.5.	Increasing field strength versus advanced isotope labeling for NMR-based fluxomics	109
3.	<i>Métabolisme de l'acétate au cours de la croissance d'Escherichia coli sur glucose</i>	131
3.1.	Acetate fluxes in Escherichia coli are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway.....	135
4.	<i>Base moléculaire de la robustesse métabolique de la voie des acides aminés branchés</i>	167
4.1.	Revisiting the BCAA pathway of E. coli reveals the molecular basis of its robustness and homeostasis	169
4.2.	Mécanismes de formation et devenir du Propionyl-CoA.....	200
	• Identification des voies de synthèse.....	201
	• Mécanisme de formation	202
5.	<i>Impact de la disponibilité en fer sur le métabolisme carboné</i>	210
5.1.	Introduction	210
	• Généralités	210

• Choix des souches	211
5.2. Effet de la concentration en fer sur la croissance d'E. coli K-12	
MG1655.....	213
5.3. Analyse de l'exométabolome	216
• Identification des métabolites	216
• Quantification des produits du métabolisme selon la disponibilité en fer	218
5.4. Effet de l'absence de sidérophore sur la croissance d'E. coli	221
• Croissance de <i>E. coli</i> K-12 MG1655 $\Delta entE$	221
• Exométabolome d' <i>E. coli</i> K-12 MG1655 $\Delta entE$	222
• Quantification des sidérophores produits lors d'un excès en fer	227
• Importance de l'assimilation du fer ferreux.....	228
5.5. Etude de souches E. coli B2 commensales	229
• Suivi de croissance d'ECN et d'ECN $\Delta entD \Delta clbA$	231
• Analyse des surnageants de cultures	232
• Analyse de la souche commensale <i>E. coli</i> SE15.	234
5.6. Discussion.....	235
6. Conclusion et perspectives.....	240
6.1. Conclusions	240
• Développement RMN pour l'analyse fonctionnelle des réseaux métaboliques.	240
• Métabolisme de l'acétate au cours de la consommation de glucose	241
• Effet de la mutation frameshift <i>ilvG</i> sur le métabolisme d' <i>E. coli</i> K-12.....	244
• Le 2-ketobutyrate : un métabolite clef dans la régulation de la voie des BCAA.	245
• L'activité des enzymes [Fe-S] de la voie des BCCA est étroitement liée à la disponibilité en fer.....	247
• Toutes les souches d' <i>E. coli</i> ne sont pas égales vis-à-vis de la disponibilité en fer.	248
• Régulation et contrôle métabolique dans la voie des BCAA.....	249

6.2. Perspectives.....	250
• Mise en application de la Pure Shift Heteronuclear 2D J-Resolved.	250
• Application du nouveau modèle de régulation de la voie des BCAA à la production de molécules d'intérêts.....	251
• Induction de la réponse stringente par l'absence de fer.	252

Table des illustrations

Figure 1: <i>E. coli</i> observée en microscopie électronique à transmission (x 10 000).....	30
Figure 2 : Relations phylogénétiques de souches d' <i>E. coli</i>	31
Figure 3 : Phylogénie du groupe <i>E. coli</i> K-12 : Relations entre la souche sauvage et les souches de laboratoires MG1655, W3110 et BW25113	34
Figure 4: Schéma type d'une structure d'acide aminé.....	39
Figure 5 : Voie de synthèse des acides aminés branchés..	41
Figure 6: Mécanisme de transformation de la thréonine en 2-ketobutyrate par la thréonine deaminase.....	42
Figure 7: Réactions de biosynthèse catalysées par les AHAS. ThDP : Thiamine diphosphate	46
Figure 9 : Mécanisme de transformation du 2,3-dihydroxy-3-methylbutanoate (DHMP) en 3-methyl-2-oxopentanoate par la dihydroxy-acide déshydratase	52
Figure 10 : Représentation schématique de l'imbrication du métabolisme du fer dans le métabolisme carboné	56
Figure 11 : Mécanisme d'assimilation sur fer chez <i>E. coli</i>	60
Figure 12: Les sidérophores produits par <i>E. coli</i>	62
Figure 13: Réaction de formation des radicaux libres.....	65
Figure 14 : Méthodes d'analyse des isotopes de l'alanine par RMN et MS.	80
Figure 15: Comparaison entre une acquisition ^1H avec couplage homonucléaire et une acquisition Pure Shift.....	83
Figure 16 : (top) Pulse sequence of the het-2DJ experiment with an adiabatic z-filter after the t_1 evolution. (bottom) The methyl signals of a 50:50 mix of $\text{U-}^{13}\text{C}$ and $\text{U-}^{12}\text{C}$ Ala in the het-2DJ experiment, with (left) or without (middle) ^{13}C decoupling during the acquisition. Omitting the ^{13}C $\pi/2$ pulse after the t_1 evolution in the absence of ^{13}C decoupling simplifies the square of the ^{13}C bound protons to a diagonal (right).	93
Figure 17 : Fine structure of the methyl signals of $\text{U-}^{12}\text{C}$ (top) and $\text{U-}^{13}\text{C}$ (bottom) Ala. $^1\text{H-}^1\text{H}$ proton couplings show up as a square pattern in the het-2DJ experiment (left), as a diagonal in the Pell-Keeler het-2DJ experiment (middle), and are fully suppressed in the pure shift het-2DJ experiment	

(right). Both direct and long-range ^1H – ^{13}C couplings are maintained along the diagonal for all experiments.....	95
Figure 18 : Comparison of the 1D proton spectrum (top, red) of a PT labeled bacterial lysate and the projected 1D (top, black) of the tilted Pell-Keeler het-2DJ experiment (bottom) on the same sample. Only the ^{12}C linked methyl protons are shown.....	97
Figure 19 : Pulse sequence for the pure shift het-2DJ experiment. (a) N-type sequence; (b) R-type sequence. Trapezoidal pulses with double arrows are frequency-swept low flip-angle pulses (PSYCHE saltire). Trapezoidal ^{13}C pulses with single arrow are frequency-swept 180° pulses. Full details of the pulse sequence are given in Figure S7.	99
Figure 20 : Methyl region of the pure shift het-2DJ experiment on the lysate of a PT bacterial sample (top). The spectrum below is the expansion of the V (^{12}C)Hy1 methyl resonance. This is a sum of ^1H – ^{13}C multiplets from individual isotopomers (Figure S8). The intensities of the different peaks correspond to the theoretical labeling expected for a PT sample.	100
Figure 21 : (A) Superposition of the pure shift het-2DJ spectra of the bacterial lysates of a PT sample (black) and of the sample grown on $\text{U-}^{13}\text{C}$ glucose and unlabeled Thr (red). Val and Leu are uniformly ^{13}C labeled in the latter, but for Ile, the $\text{C}_{\gamma 2}$ but not the C_δ methyl is ^{13}C labeled. The splitting for the Ile H_δ methyl protons (B) and the Ile $\text{H}_{\gamma 2}$ methyl group (C) are in agreement with a heteronuclear J-coupling toward a common $^{13}\text{C}_\beta$ carbon and point to the C_β – $\text{C}_{\gamma 2}$ moiety coming from a pyruvate molecule that finds its origin in the $\text{U-}^{13}\text{C}$ labeled glucose, whereas the rest comes from the unlabeled threonine (D).....	103
Figure 22 : Spectra of the Tyr H_ϵ aromatic proton in the PT sample recorded at different field strengths.....	112
Figure 23 : Differential field dependence of chemical shift and J-coupling.	116
Figure 24 : Methyl region of the BCAAs at different field strength.	118
Figure 25 : Simplified metabolic network of <i>E. coli</i> showing the ^{13}C and ^2H labeling patterns of leucine (LEU), isoleucine (ILE), and valine (VAL) when $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -glucose (GLC), $^{12}\text{C}, ^1\text{H}$ -threonine (THR), and $^{12}\text{C}, ^2\text{H}$ -ketoisovalerate (KIV) are used as label input.....	119
Figure 26 : Erasing the Leu/Val methyl signals through use of deuterated keto-isovalerate.....	121
Figure 27 : Voie de production / assimilation de l'acétate chez <i>E. coli</i>	132
Figure 28 : Representation of <i>E. coli</i> pathways involved in acetate metabolism	138

Figure 29 : Incorporation of ^{13}C atoms in central metabolites after a pulse of ^{13}C -acetate during exponential growth on glucose or during the acetate consumption phase.	142
Figure 30 : Quantification of acetate consumption and production fluxes by dynamic ^{13}C -metabolic flux analysis.	144
Figure 31 : In silico analysis of the Pta-AckA pathway, and experimental validation of model predictions.	147
Figure 32 : Net acetate accumulation flux and unidirectional production and consumption fluxes in <i>E. coli</i> K-12 MG1655 WT, ΔackA , Δacs and ΔpoxB grown on glucose and different acetate concentrations.	150
Figure 33 : Short-term response of the Pta-AckA flux to an acetate pulse. <i>E. coli</i> was grown on M9 supplemented with 15 mM glucose.	152
Figure 34 : <i>E. coli</i> can co-consume acetate and glycolytic carbon sources. <i>E. coli</i> was grown on M9 supplemented with 15 mM gluconate or fucose.	153
Figure 35 : The BCAA pathway.	173
Figure 36 : Workflow for metabolites identification based on NMR spectrum	176
Figure 37 : Metabolic pathway of propionyl-CoA formation (Threonine degradation)	177
Figure 38 : Elucidation of the production of DHIV and DHMP in <i>E. coli</i>	179
Figure 39 : In-vitro analyses of AHAS in the presence of pyruvate.	181
Figure 40 : Delta of optical density (OD) between the addition of KBU and end of growth of the control condition (without addition).	183
Figure 41 : Mise à jour des voies métaboliques produisant du propionate via la dégradation de la thréonine	200
Figure 42 : Quantification intracellulaire du propionyl-CoA.	203
Figure 43 : Evolution au cours du temps de la consommation de glucose, de la production d'acétate et de la concentration biomasse d' <i>E. coli</i> K-12 MG1655 cultivée sur glucose avec 10 μM de Fe^{3+}	213
Figure 44 : Taux de croissance d' <i>E. coli</i> K-12 MG1655 WT à différentes concentrations en Fe^{3+}	214
Figure 45 : Quantification des métabolites de la voie des BCAA chez <i>E. coli</i> K-12 MG1655 WT pour différentes concentrations en Fe^{3+}	218
Figure 46 : Taux de croissance d' <i>E. coli</i> K-12 MG1655 ΔentE à différentes concentrations en Fe^{3+}	222

Figure 47: Quantification des métabolites de la voie des BCAA chez <i>E. coli</i> K-12 MG1655 Δ entE pour différentes concentrations en Fe^{3+} .	223
Figure 48: Suivre de culture d' <i>E. coli</i> K-12 MG1655 Δ entE en présence ou en absence de valine, leucine et isoleucine.	226
Figure 49: Dosage des sidérophores produits en condition non limitante en fer (100 μM) par la souche <i>E. coli</i> MG1655 WT mais aussi par un mutant de leur synthèse.	227
Figure 50: Taux de croissance à différentes concentrations en Fe^{3+} pour <i>E. coli</i> B2 Nissle 1917 et <i>E. coli</i> B2 Nissle 1917 Δ entD Δ clbA.	231
Figure 51: Quantification des métabolites de la voie des BCAA chez <i>E. coli</i> B2 Nissle 1917 et <i>E. coli</i> B2 Nissle 1917 Δ entD Δ clbA pour différentes concentrations en Fe^{3+} .	232
Figure 52: Dosage des sidérophores produits en condition non limitante en fer (100 μM) pour la souche <i>E. coli</i> MG1655 ainsi que les souches commensales ECN et SE15.	234
Figure 53: Impact du ratio 2-Ketobutyrate (KBU) / Pyruvate (Pyr) sur la croissance d' <i>E. coli</i> MG1655. Schéma récapitulatif.	246
Figure 54: Représentation des liens de régulations qui lient le métabolisme du fer à la voie des BCAA	253

Index des tableaux

Tableau 1: *Fréquence des acides aminés chez différents règnes (extrait de (Kozlowski 2017))* 40

Tableau 2: *Liste des protéines fer-soufre chez E. coli* 57

Abréviations

2		acétyl-coA synthétase	Embden-Meyerhof-Parnas
		(Acs), 36	(EMP), 36
	2,3-dihydroxy-3-	acétyl-transférase	F
	methylbutanoate	(Pta), 131	
	(DHMP), 51	acide nitreux	Ferric Uptake Regulation
	2,3-dihydroxyisovalerate	(NA), 32	(FUR), 65
	(DHIV), 51	acides aminés branchés	H
	2-hydroxyethyl-ThDP	(BCAA), 26	
	(HETHDP), 179	acridine orange	Heteronuclear Multiple Bond
	2-Isopropylmalate	(AO), 32	Correlation
(2-IPM), 217	ATP Binding Cassette	(HMBC), 82	
2-Isopropylmalate synthase	(ABC), 64	Heteronuclear Single Quantum	
(IPMS), 54		Correlation	
2-oxobutanoate		(HSQC), 82	
(2OB), 102		High-Performance Liquid	
3		cAMP receptor protein	Chromatography
		(CRP), 47	(HPLC), 240
	3-(Trimethylsilyl)propionic-	Cystéine Sulfinatase Desulfinate	hydroxyacide réducto-isomérase
	2,2,3,3-d4 acid	(CSD), 67	(KARI), 51
	(TSP), 187		I
		dihydroxy-acid déshydratase	
		(DAD), 51	Iron Sulfur Cluster
	A		(Isc), 67
	acétate kinase		isocitrate lyase
	(AckA), 131		(Icl), 37
acétolactate synthase	E. coli Nissle 1917	isoleucine	
(AHAS), 34	(ECN), 212		

(Ile), 111	MultiLocus Sequence Typing	R
isopropylmalate isomerase	(MLST), 31	
(IPMI), 54		Reactive Oxygen Species
Isotope Dilution Mass	N	(ROS), 65
Spectrometry	nonribosomal peptide synthase	résonance magnétique
(IDMS), 79	(NRPS), 62	nucléaire)
		(RMN), 26
K	P	Ribonuclease PH
keto-butyrates	Pascal triangle	(RNase PH), 33
(KBU), 111	(PT), 91	S
L	phosphoénolpyruvate	S-Adénosyl-Méthionine
leucine	carboxykinase	(SAM), 68
(Leu), 111	(Pck), 37	signal-to-noise ratio
Leucine-responsive Regulatory	phosphoénolpyruvate	(SNR), 95
Protein	carboxylase	spectrométrie de masse
(LRP), 49	(Ppc), 37	(SM), 26
l'isocitrate déshydrogénase	phosphoénolpyruvate	Sulfur mobilization
(Icd), 37	synthétase	(Suf), 67
	(Pps), 37	superoxydes dismutases
M	phosphofructokinase	(SOD), 66
Major Facilitator Superfamily	(PfkA), 37	T
(MFS), 63	Polyketide synthase	threonine
malate synthase	(PKS), 63	(Thr), 111
(Mls), 37	Pure Shift Yielded by Chirp	thréonine désaminase
méthanesulfonate d'éthyle	Excitation	(TDA), 42
(EMS), 32	(PSYCHE), 84	
monoxyde d'azote	pyruvate kinase	V
(NO), 52	(pykF), 37	valine
Multi-Locus Enzyme	pyruvate oxydase	(Val), 111
Electrophoresis	(PoxB), 36	valine, isoleucine and leucine
(MLEE), 30		

(VIL), 177

Introduction générale

Par définition, le métabolisme est l'étude de l'ensemble des processus physiques et chimiques qui se déroulent au sein d'un organisme qu'il soit mono- ou pluricellulaire. De manière simpliste, il peut être décomposé en deux processus fortement connectés :

- Le catabolisme (processus exergonique), consistant en la dégradation de molécules plus ou moins complexes, permettant de récupérer de l'énergie sous forme redox (NADH, FADH₂, *etc.*) ou chimique (ATP, *etc.*), une partie étant dissipée hors de la cellule sous forme de chaleur.
- L'anabolisme (processus endergonique), consistant en l'utilisation de l'énergie rédox et chimique récupérées et d'intermédiaires métaboliques pour la biosynthèse de macromolécules constitutives de la cellule (protéines, lipides, polysaccharides, *etc.*).

Les micro-organismes, tels que les bactéries, possèdent d'importantes capacités à moduler leur métabolisme pour répondre à des perturbations environnementales physico-chimiques (température, pH, O₂) et nutritionnelles (carbone, azote, sels, oligoéléments), mais également à des modifications naturelles (évolution, acquisition transversale de gènes, mutation spontanée, *etc.*) ou synthétiques (ingénierie métabolique) de leur génome. Comprendre ces mécanismes de régulation est fondamental pour appréhender les interactions complexes qu'il existe entre les micro-organismes au sein des consortia par exemple, entre les micro-

organismes et leur niche écologique, ou bien optimiser la production industrielle de molécules à haute valeur ajoutée en biotechnologie.

Au cours de ce travail de thèse, le métabolisme de la bactérie *Escherichia coli* K-12 MG1655 a fait l'objet d'une étude approfondie visant à mieux comprendre comment celui-ci permet à la bactérie de s'adapter à des contraintes nutritionnelles imposées par la présence de plusieurs sources de carbone (glucose et acétate), par la carence en fer, un oligoélément essentiel pour la bactérie, et enfin par une mutation présente au sein du génome de cette souche bactérienne et touchant à une voie métabolique complexe et centrale pour la biosynthèse des acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine), ces derniers représentant 20% de la composition des protéines en acides aminés (Pramanik and Keasling 1998). Pour atteindre ces objectifs, des approches quantitatives de métabolomique et de fluxomique pour l'analyse fonctionnelle des réseaux métaboliques ont été mises en œuvre dans des conditions de culture contrôlées. Ces approches se sont essentiellement appuyées sur des méthodologies basées sur la spectrométrie de masse (SM) et la résonance magnétique nucléaire (RMN), déjà en place dans l'équipe MetaSys ou développées au cours de ce travail de thèse.

Ce manuscrit est organisé en un chapitre de bibliographie et quatre chapitres de résultats. Le premier chapitre a pour objectif de positionner les travaux de la thèse dans le contexte des connaissances actuelles. Une partie est notamment focalisée sur la voie métabolique de biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA). Le premier chapitre de résultats décrit une nouvelle méthode RMN développée au cours de cette thèse et visant à faciliter l'identification et la quantification de métabolites notamment sur des spectres complexes. Ce développement a fait l'objet d'une publication dans *Magnetic Resonance in Chemistry* (Dinclaux *et al.* 2020). Le second

chapitre de résultat porte sur la transition glucose → acétate et plus précisément sur les flux d'échange d'acétate au cours de la phase de croissance de glucose. Ce travail s'inscrit dans un projet plus large développé dans l'équipe MetaSys et constitue le socle d'un article scientifique publié dans Scientific Report (Enjalbert *et al.* 2017). Le troisième chapitre de résultats concerne le fonctionnement et la régulation de la voie métabolique des BCAA chez *E. coli*. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article à soumettre pour publication. Le quatrième chapitre de résultats traite du lien entre la voie métabolique des BCAA et le métabolisme du fer, et de l'implication de la réponse « stringente ». Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui reprend les découvertes et les éléments clés qui émergent de ce travail de thèse et présente les perspectives essentielles à mener.

1. Etude bibliographique

1.1. *Escherichia coli*

- **Le genre *Escherichia***

L'un des microorganismes le plus utilisé pour étudier le métabolisme est *Escherichia coli*. Le genre *Escherichia* fut décrit pour la première fois en 1885 par le pédiatre allemand Théodore Escherich, après l'avoir isolé de selles de nourrissons atteints de diarrhées néonatales. C'est plus tard, en 1919, que l'appellation *Escherichia* sera officialisée par (Castellani and Chalmers 1919), pour rendre hommage aux travaux du pédiatre allemand.

E. coli est un bacille gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* (**Figure 1**). Bactérie anaérobie facultative, elle est aussi l'espèce commensale majoritaire du microbiote intestinal aérobie humain et animal. Il s'agit aussi d'une des premières bactéries à coloniser l'intestin encore stérile des nouveau-nés à partir du microbiote vaginal de la mère (Tenaillon *et al.* 2010). Cruciale dans le développement du microbiote, elle permet la mise en place d'un environnement pauvre en oxygène. En effet, l'utilisation de son métabolisme aérobie va progressivement épuiser le milieu en oxygène jusqu'à atteindre l'anoxie, et permettre le développement de micro-organismes anaérobies strictes.

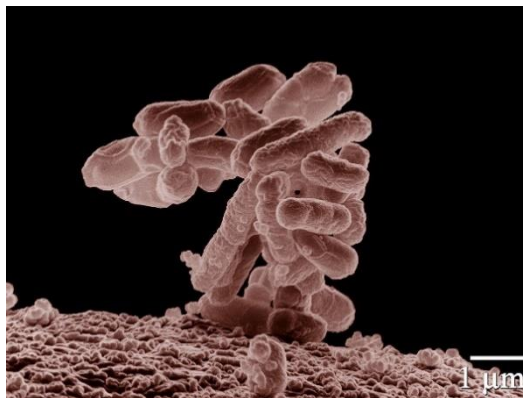


Figure 1: *E. coli* observée en microscopie électronique à transmission (x 10 000)

En plus de l'espèce *coli*, quatre autres espèces du genre *Escherichia* ont été mises en évidence : *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, et *Escherichia albertii* (Brenner et al. 1982, Brenner et al. 1982, Farmer et al. 1985, Huys et al. 2003).

- **La phylogénie du genre *Escherichia***

En 1984, suite aux résultats du MLEE [Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (Whittam et al. 1983)], une collection de référence d'*E. coli* (ECOR) a été établie par Ochman et Selander (Ochman and Selander 1984). ECOR est un ensemble de 72 souches d'*E. coli* provenant de mammifères représentatives de la biodiversité. Une analyse métabolique a été réalisée sur l'ensemble de ces bactéries pour les caractériser (Miller and Hartl 1986). Neuf traits phénotypiques ont été utilisés dont la capacité à croître sur sept sources de carbone, la motilité sur agar, et la capacité à décarboxyler l'ornithine. Complétée par une seconde étude MLEE plus poussée (35 enzymes au lieu de 11), une première phylogénie a permis de définir six groupes nommés A, B1, B2, C, D et E. Par la suite, durant les années 2000, le séquençage

des génomes chez *E. coli* est devenu une routine qui a abouti à de nouvelles techniques dont le MLST : **M**ulti**L**ocus **S**equencing **T**yping (Chaudhuri and Henderson 2012). Cette alternative au MLEE a notamment permis de définir la phylogénie d'*E. coli* actuelle (**Figure 2**) sur laquelle est basée la dénomination des souches d'*E. coli* utilisées dans ce travail de thèse.

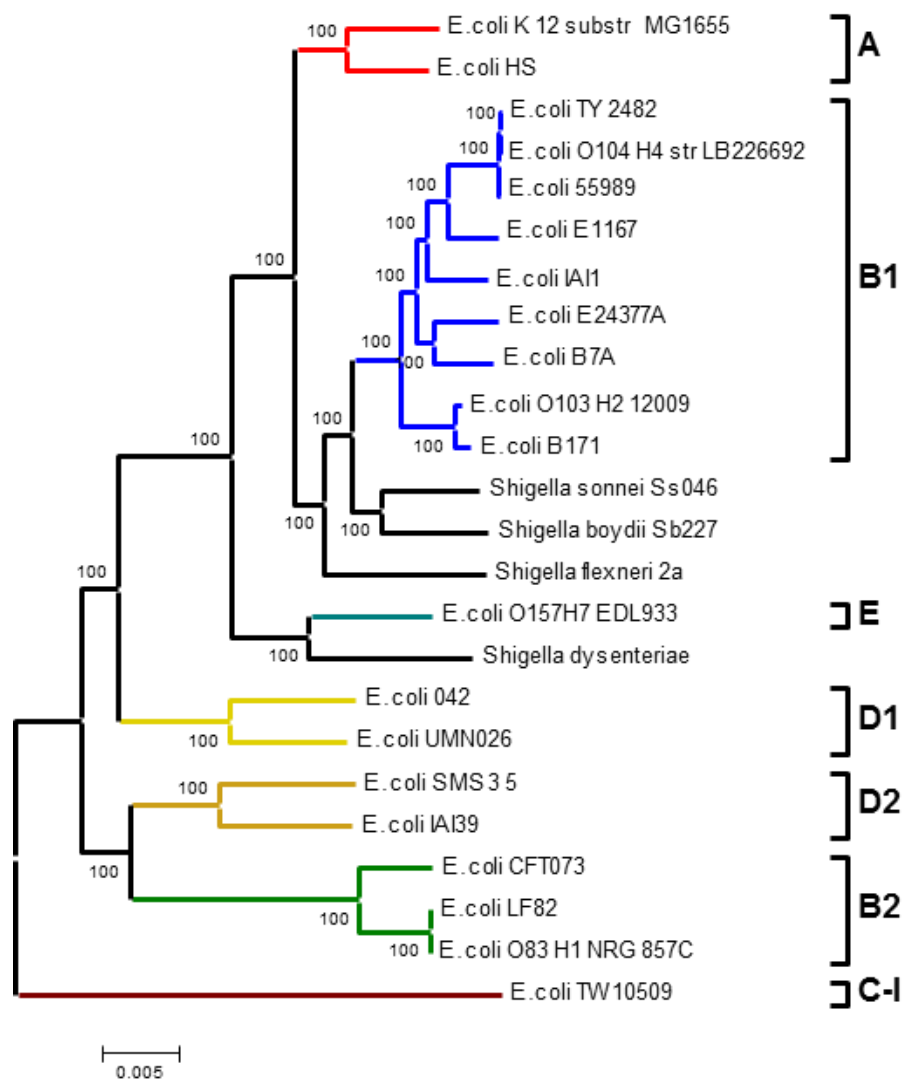


Figure 2 : Relations phylogénétiques de souches d'*E. coli* (Chaudhuri and Henderson 2012)

1.2. Le groupe phylogénétique K-12 : un modèle d'étude

- **Origine du groupe phylogénétique K-12**

La souche sauvage d'*E. coli* K-12 fut isolée en 1922, à partir des matières fécales d'un patient en convalescence atteint de diphtérie, avant d'être incluse dans la collection du département bactériologique de Stanford. Après une caractérisation de la souche au début des années 1960, il s'est avéré que 30 années de culture en laboratoire ont induit une perte des structures antigéniques typiques des souches sauvages (Orskov and Orskov 1961). Ainsi la *E. coli* K-12 sauvage n'est désormais plus en mesure de coloniser l'intestin humain (Smith 1975) mais reste toujours un des principaux modèles d'étude.

Les premières souches mutantes dérivées de la K-12 (l'une auxotrophe pour la thréonine, et l'autre pour la biotine) ont été générées en 1944 par irradiation aux rayons X (Gray and Tatum 1944). Une majorité des souches utilisées actuellement dérivent de ces 2 premiers mutants bien que ces souches aient ensuite subi des modifications supplémentaires, par l'utilisation d'agents mutagènes tels que l'acridine orange (souvent abrégé AO), le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), l'acide nitreux (NA), le N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, d'agents alkylants de type « moutarde azotée », mais aussi d'irradiations aux UV ou aux rayons X. A ces modifications générées par des expérimentateurs, s'additionnent des mutations spontanées. Le résultat de ces mutations ont conduit aux souches actuellement utilisées en laboratoire comme modèle d'étude.

- ***E. coli* au laboratoire**

Depuis son séquençage en 1997 (Blattner *et al.* 1997), la souche *E. coli* MG1655 est devenue un modèle d'étude utilisé dans la majorité des laboratoires. Cette souche, comme toutes les souches dérivées d'*E. coli* K-12, est le fruit de

plusieurs mutations de la souche K-12 WT (**Figure 3**). Parmi les mutations identifiées dans son génome, deux retiennent particulièrement l'attention pour celui qui s'intéresse au métabolisme: *rph-1* et *ilvG*. La première est une mutation frameshift (décalage du cadre de lecture) dans le gène *rph* situé dans l'opéron *rph-pyrE*. A première vue cette mutation a pour conséquence l'apparition précoce d'un codon stop qui se traduit par la synthèse d'une Ribonuclease PH (RNase PH) tronquée et inactive. Or ,en plus de ce constat, il a pu être noté que l'enzyme codée par le gène *pyrE*, gène situé juste après le gène *rph* muté, a une expression diminuée dans cette souche (Jensen 1993, Jensen *et al.* 1986). Cette baisse est expliquée par une perturbation d'un atténuateur inter-génique situé entre les deux gènes qui ne remplit plus son rôle correctement et affecte de ce fait sa transcription. L'orotate phosphoribosyltransferase (codée par *pyrE*) est essentielle à la formation de l'uridine monophosphate (Jensen 1993). La diminution de la quantité d'enzyme active se traduit alors par une diminution de son activité spécifique, ayant pour conséquence une accumulation en amont de la voie des précurseurs (orotate et dihydroorotate) dont on constate l'accumulation dans le milieu de culture (Enjalbert *et al.* 2013, Womack and O'Donovan 1978), et en aval une limitation de la formation de pyrimidine. Cette limitation est loin d'être anecdotique puisque l'ajout d'uracile dans le milieu de culture permet d'augmenter de 15% le taux de croissance des souches K-12 (Jensen 1993) . Ce résultat met en évidence l'impact de mutations frameshift sur la croissance et plus largement sur la physiologie des cellules.

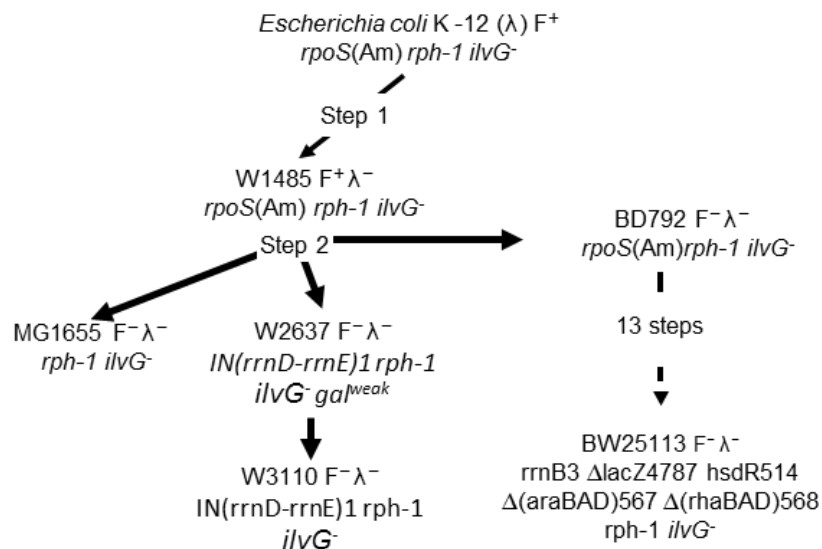


Figure 3 : Phylogénie du groupe *E. coli* K-12 : Relations entre la souche sauvage et les souches de laboratoires MG1655, W3110 et BW25113. Adapté de (Baba et al. 2006, Hayashi et al. 2006). Ajout de la mutation *ilvG*⁻ pour l'ensemble des K-12 (Lawther et al. 1981).

La deuxième mutation présente sur le génome de la souche *E. coli* MG1655 est portée par le gène *ilvG* qui code pour l'acétolactate synthase II (AHAS II) : une des trois acétolactates synthases, codées dans le génome d'*E. coli*. Comme dans le cas de *rph*, il s'agit d'une mutation frameshift sur un gène de l'opéron *ilvGMEDA*. La présence de cette modification va induire l'apparition d'un codon stop dans la séquence codante d'*ilvG*, et générer une protéine tronquée inactive. Au niveau physiologique, les *E. coli* qui portent cette mutation sont valine-sensibles ; c'est-à-dire qu'en présence de valine dans l'environnement, la bactérie n'est plus capable de croître. En effet, la présence de valine a pour conséquence d'inhiber les activités des deux autres AHAS, dont la conséquence au vue de la structure de la voie métabolique, est de générer une pseudo-auxotrophie en isoleucine (De Felice et al. 1979). Le mécanisme métabolique à l'origine de ce phénomène est détaillé plus précisément dans une autre partie (voir chapitre 1.3.3). Actuellement, les

connaissances liées à cette mutation se limitent au blocage de la croissance par la valine. Or approximativement 1/5 des acides aminés protéinogéniques est synthétisé par la voie des BCAA (**Tableau 1**). De manière associée à l'inhibition de la croissance par la présence de valine, (Andersen *et al.* 2001) ont observé des oscillations d'apport en oxygène au cours de fermentations, ralentissant la croissance et la production de protéines recombinantes. Ce phénomène peut cependant être arrêté en ajoutant de l'isoleucine ou en utilisant une souche dont l'AHAS II est fonctionnelle. Après une étude poussée, il s'avère que ce comportement est dû à des répétitions de toxicité induites par la valine qui inhibe les AHAS I et III et génère une pseudo-auxotrophie en isoleucine. Néanmoins, compte tenu du volume d'expériences réalisées avec cette souche d'*E. coli*, la conséquence de cette mutation apparaît finalement relativement limitée sur un plan métabolique dans la mesure où il n'y a pas d'autres phénotypes rapportés dans la littérature. Ceci suggère donc que l'homéostasie en acides aminés branchés est correctement maintenue et qu'il existe des mécanismes de régulation compensatoires pour contrôler la concentration intracellulaire en valine.

1.3. Régulation du métabolisme carboné chez *E. coli*

- **Transition glucose/acétate**

En condition de croissance aérobie sur glucose, la croissance d'*E. coli* s'accompagne de l'excrétion d'acétate qui représente 6 à 18 % des carbones du glucose consommé (Luli and Strohl 1990) (**Figure 4**). Une fois le glucose totalement consommé dans le milieu de culture, celui de l'acétate s'enclenche (Enjalbert *et al.* 2013). Si cette seconde phase s'accompagne d'une croissance, ce qui est généralement observé pour *E. coli* (Wolfe 2005), alors on a un comportement de croissance biphasique et cette dernière est qualifiée de diauxique. La première phase,

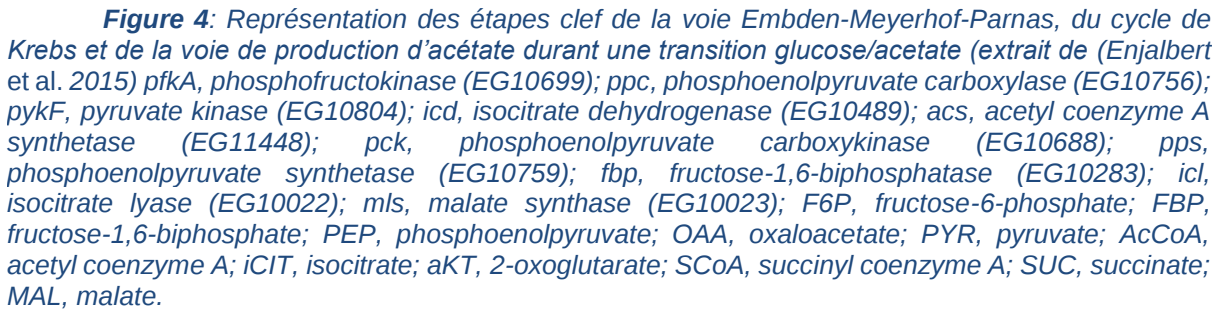
sur le glucose, s'accompagne d'un métabolisme glycolytique alors que la seconde sur acétate, correspond à un métabolisme gluconéogénique (El-Mansi *et al.* 2006, Wolfe 2005).

La voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) est la principale voie glycolytique pour convertir le glucose en pyruvate (Romano and Conway 1996). Au cours de la croissance sur glucose, la majeure partie du pyruvate est convertie en acétyl-coA qui alimente le cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques). Couplées à la phosphorylation oxydative, ces voies fournissent de l'énergie et des précurseurs essentiels pour assurer la croissance de la cellule. Une partie de l'acétyl-coA est orientée dans la voie Pta/AckA, exprimée constitutivement, conduisant à l'excrétion d'acétate mentionnée ci-avant (Brown *et al.* 1977). Il est à noter que l'accumulation de pyruvate active l'enzyme PoxB (pyruvate oxydase) qui catalyse la transformation de pyruvate en acétate et en CO₂. Une des raisons de son activité serait alors de réduire le flux vers l'acétyl-CoA et maintenir l'homéostasie de ce métabolite qui joue un rôle central dans le métabolisme (Abdel-Hamid *et al.* 2001). Au contraire de la voie Pta/AckA, l'expression du gène codant pour PoxB est inductible, sous dépendance du facteur de transcription RpoS. Ainsi, cette enzyme serait induite dès l'entrée en phase stationnaire (Chang *et al.* 1994).

A l'inverse, lors de la croissance sur acétate, ce substrat est converti en acétyl-coA par la voie Pta/AckA qui est donc réversible (Castano-Cerezo *et al.* 2009). Mais lorsque la concentration d'acétate est inférieure à 10 mM, l'acétate est principalement pris en charge par l'acétyl-coA synthétase (Acs), codée par le gène inductible *acs* (Kumari *et al.* 1995). Acs convertit en une seule étape l'acétate en acétyl-CoA dans un processus biochimique consommant l'équivalent de 2 ATP (Brown *et al.* 1977). Ensuite, l'acétyl-coA rejoint le cycle de Krebs. Dans ce cas de figure, celui-ci est

complété par le cycle glyoxylique, qui constitue d'une certaine manière, une dérivation au cycle de Krebs. En effet, le flux de carbone est alors partagé entre l'isocitrate déshydrogénase (Icd), enzyme du cycle de Krebs, et l'isocitrate lyase (Icl), enzyme du cycle glyoxylique. Couplée à la malate synthase (Mls), Icl permet de court-circuiter les deux étapes de décarboxylation oxydative du cycle de Krebs en convertissant l'isocitrate en malate et en succinate *via* la formation de glyoxylate (Walsh and Koshland 1984).

Cette alternative au cycle complet de Krebs constitue un compromis métabolique dans la mesure où le cycle glyoxylique permet de produire de la biomasse, mais avec un rendement de récupération d'énergie bien inférieur (Wolfe 2005). Outre la partition Icd/Icl, trois autres enzymes sont exprimées lors de la croissance sur acétate pour inverser le flux dans la voie EMP (Oh *et al.* 2002) : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Pck) (oxaloacétate en phosphoénolpyruvate et catalysant la réaction opposée à la phosphoénolpyruvate carboxylase (Ppc)), la phosphoénolpyruvate synthétase, (Pps) (pyruvate en phosphoénolpyruvate et catalysant la réaction opposée à la pyruvate kinase, pykF), et la fructose-1,6 biphosphatase, Fbp (fructose-1,6-biphosphate en fructose-6-phosphate et catalysant la réaction opposée à la phosphofructokinase, PfkA) (**Figure 4**).



38

2013). Par conséquent, le comportement métabolique d'*E. coli* au cours de sa transition naturelle glucose → acétate reste en partie à élucider.

- **La voie des acides aminés branchés**

La valine, la leucine et l'isoleucine sont des acides aminés branchés, (BCAA pour Branched Chain Amino Acids) puisque leur chaîne latérale est ramifiée. Ils constituent une famille d'acides aminés entrant dans la composition des protéines de la cellule (acides aminés protéinogéniques). De manière générale, les acides aminés sont les briques élémentaires des protéines. Ce sont des composés constitués d'une fonction carboxylique (COOH), d'une fonction amine (NH₂), et d'une chaîne latérale variable (Figure 5).

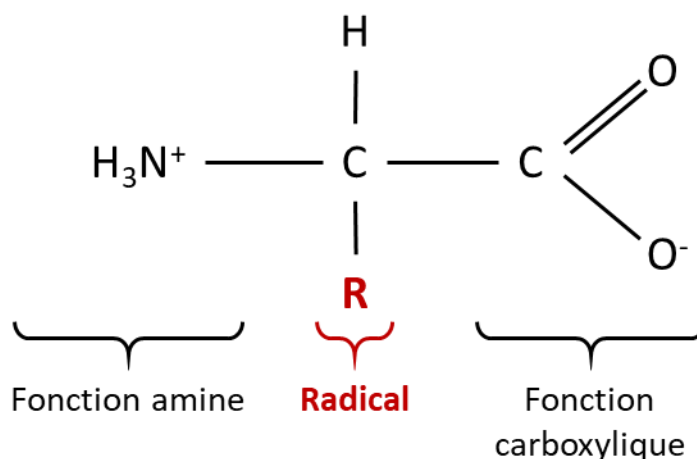


Figure 5: Schéma type d'une structure d'acide aminé

Il existe 20 acides aminés protéinogéniques chez *E. coli*. Ils sont habituellement classés en fonction de leur chaîne latérale : chargés positivement ou négativement selon le pH, aromatiques, hydrophiles, et apolaires. Les acides aminés à chaîne latérale hydrophobe sont extrêmement importants dans la structure des protéines. Ils jouent un rôle crucial dans la structure des protéines. Ils se retrouvent principalement au cœur des structures afin de minimiser les contacts avec l'eau, et

jouent un rôle essentiel dans le maintien de la stabilité (Tanford 2002). Les BCAA sont parmi les acides aminés les plus hydrophobes. A eux trois ils composent près des 23% du protéome des bactéries, avec 5,89% d'isoleucine, 10,09% de leucine et 7,27% de valine, (Kozlowski 2017) (**Tableau 1**).

Tableau 1: Fréquence des acides aminés chez différents règnes (extrait de (Kozlowski 2017))

	Ala	Cys	Asp	Glu	Phe	Gly	His	Ile	Lys	Leu	Met	Asn	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	Val	Trp	Tyr
Virus	6.61	1.76	5.81	6.04	4.25	5.79	2.15	6.53	6.35	8.84	2.46	5.41	4.62	3.39	5.24	7.06	6.06	6.50	1.19	3.94
Archée	8.20	0.98	6.21	7.69	3.86	7.58	1.77	7.03	5.27	9.31	2.35	3.68	4.26	2.38	5.51	6.17	5.44	7.80	1.03	3.45
Bactérie	10.06	0.94	5.59	6.15	3.89	7.76	2.06	5.89	4.68	10.09	2.38	3.58	4.61	3.58	5.88	5.85	5.52	7.27	1.27	2.94
Eucaryote	7.63	1.76	5.40	6.42	3.87	6.33	2.44	5.10	5.64	9.29	2.25	4.28	5.41	4.21	5.71	8.34	5.56	6.20	1.24	2.87
Global	8.76	1.38	5.49	6.32	3.87	7.03	2.26	5.49	5.19	9.68	2.32	3.93	5.02	3.90	5.78	7.14	5.53	6.73	1.25	2.91

Les BCAA sont synthétisés chez *E. coli* par une voie métabolique constituée de deux branches (**Figure 6**) dont, de manière remarquable, une grande partie des réactions dépendent d'enzymes promiscuitaires. Ces enzymes catalysent en effet des transformations, présentent une spécificité pour plusieurs substrats et sont communes à la synthèse des BCAA. C'est finalement le substrat qui définit sur le plan chimique, l'acide aminé qui est synthétisé. La première branche permet la synthèse de l'isoleucine tandis que la seconde supporte la synthèse de la valine et de la leucine. Au total, 11 enzymes sont nécessaires à leur synthèse. Ces branches sont modulées par un rétrocontrôle des produits finaux (isoleucine, leucine et valine) sur les enzymes qui initient la synthèse de chacun des acides aminés (Lawther *et al.* 1981, Stieglitz and Calvo 1974, Umbarger and Brown 1957).

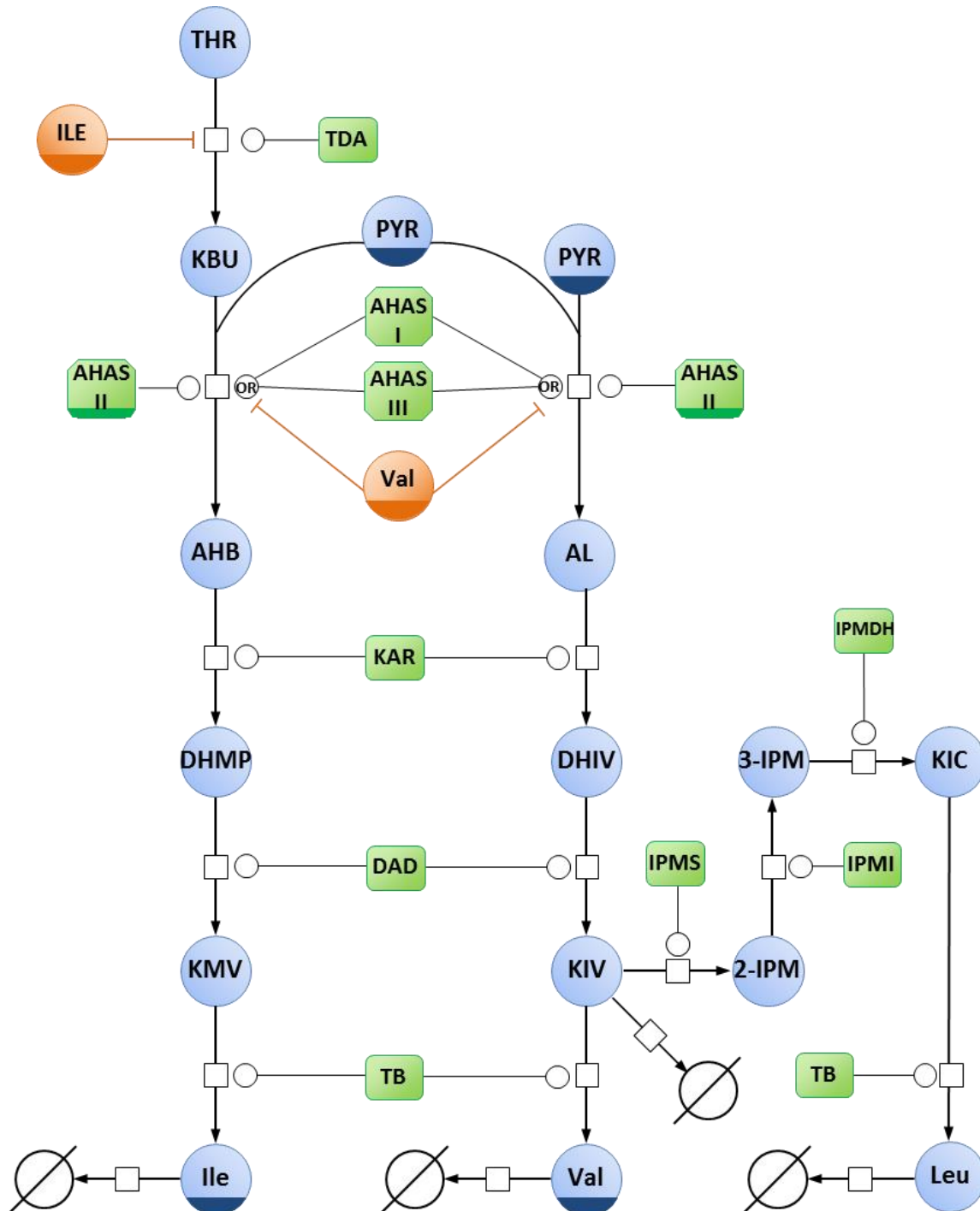


Figure 6 : Voie de synthèse des acides aminés branchés. Les enzymes impliquées dans la synthèse des BCAA sont : la thréonine désaminase (TDA) (EC 4.3.1.19), les acétolactate synthase (AHAS)(EC 4.1.3.18), l'hydroxyacide réducto-isomérase (KARI)(EC 1.1.1.86), la 2,3-dihydroxyisovalerate déhydratase (DAD)(EC 4.2.1.9), la transaminase B (TB)(EC 2.6.1.42), la 2-isopropylmalate synthase (IPMS) (EC 4.1.3.12), l'isopropylmalate isomerase (IPMI)(EC 4.2.1.33), et la 3-isopropylmalate déhydrogénase (IPMDH)(EC 1.1.1.85). Les métabolites impliqués sont : L-thréonine (THR), la L-isoleucine (Ile), la L-valine (Val), la L-leucine (Leu), le pyruvate (PYR), le 2-ketobutyrate (KBU), l'acétolactate (AL), le 2-aceto-2-hydroxybutanoate (AHB), le 2,3-dihydroxy-isovalerate (DHIV), le 2,3-dihydroxy-3-méthylpentanoate (DHMP), le 2-keto-isovalerate (KIV), le 2-keto-méthylvalerate (KMV), 2-isopropylmalate (2-IPM), le 3-isopropylmalate (3-IPM), et le 2-ketoisocaproate (KIC).

- **La thréonine désaminase**

La thréonine désaminase (TDA) est la toute première enzyme de la voie de synthèse de l'isoleucine (**Figure 6**). Elle est codée par *ilvA*, le dernier gène de l'opéron *ilvGMEDA*. Ce gène est néanmoins précédé par deux promoteurs internes à l'opéron ; *ilvAp* et *ilvEp* (Huang *et al.* 1992, Lopes and Lawther 1989) qui permettent d'assurer une transcription et une expression constitutive de la TDA, malgré la position éloignée du gène *ilvA* par rapport au promoteur principal de l'opéron. Cette enzyme de 203,8 kDa est un tétramère (Calhoun *et al.* 1973, Grimminger *et al.* 1973). Elle permet la conversion de la L-thréonine en 2-ketobutyrate (Umbarger and Brown 1956) en présence de pyridoxal 5'-phosphate (PLP) qui correspond à la forme active de la vitamine B6. (**Figure 7**) .

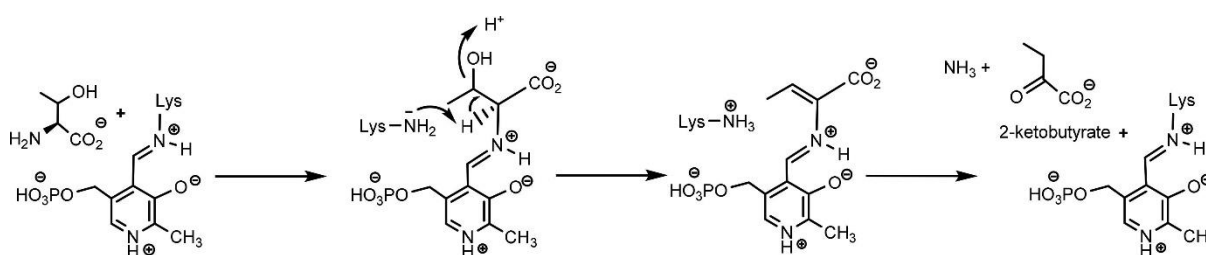


Figure 7: Mécanisme de transformation de la thréonine en 2-ketobutyrate par la thréonine déaminase (extrait de (Amorim Franco and Blanchard 2017))

Cette enzyme est l'un des premiers cas d'étude d'inhibition par une boucle de rétrocontrôle. Il a été en effet démontré que l'accumulation d'isoleucine conduit à son inhibition (**Figure 6**) (Umbarger 1956, Umbarger and Brown 1958). La TDA est une enzyme non-michaelienne. Dès 1960 Jean-Pierre Changeux conclut sur la présence de deux sites distincts pour la thréonine et l'isoleucine, l'un activateur et l'autre inhibiteur (Changeux 1961). Après de nombreuses études, il est maintenant établi que

la thréonine deaminase a un comportement allostérique dont le site de fixation de l'isoleucine peut aussi accueillir une molécule de valine. Celle-ci a un effet antagoniste à l'isoleucine, et conduit à l'activation de l'enzyme (Eisenstein 1991).

- **Une topologie atypique**

- 1.3.1. La promiscuité enzymatique: une caractéristique clef de la voie des BCAA

Généralement, les réactions enzymatiques sont décrites de manière linéaire et extrêmement spécifique : une enzyme catalyse la transformation d'un substrat en un produit. La majorité des voies métaboliques (glycolyse, voie des pentoses phosphates, cycle de Krebs, *etc.*) ont été étudiées et caractérisées selon ce principe. Cependant, ce concept s'avère désuet et trop simpliste, car il ne rend pas compte de phénomènes métaboliques observés dans la cellule. Aussi, la notion de promiscuité enzymatique émerge et est de plus en plus exploitée dans la modélisation des voies métaboliques. En effet, il est maintenant établi que des enzymes peuvent être impliquées dans la catalyse de réactions différentes (promiscuité catalytique) ou interagir avec plusieurs substrats (promiscuité de substrats). Ces enzymes sont dites globalement promiscuitaires. La première description de cette classe de protéines a été publiée en 1921 avec la pyruvate décarboxylase, pour sa capacité à former des liaisons carbone-carbone entre de nombreux métabolites (Neuberg and Hirsch 1921), indiquant une promiscuité de substrats. Il s'avère que les produits générés par ces réactions, sont de plus en plus considérés comme étant du métabolisme sous-jacent utile pour le bon fonctionnement de la cellule (Notebaart *et al.* 2018) et qu'ils contribuent à supporter l'évolution des protéines, des réseaux métaboliques et de régulation. En effet, la promiscuité enzymatique est évoquée dans plusieurs revues

comme étant l'un des points clé de l'évolution (Chevrette *et al.* 2020, Khersonsky and Tawfik 2010, O'Brien and Herschlag 1999). Elle permet de générer une certaine flexibilité métabolique qui, de manière opportuniste, peut conduire à de nouvelles fonctions plus avantageuses pour la cellule lors de modifications de l'environnement.

La voie des acides aminés branchés est un exemple canonique d'une voie métabolique entière reposant sur la promiscuité enzymatique de substrats. En effet, deux voies de synthèse parallèles permettent la formation de la valine et de la leucine d'une part, et de l'isoleucine d'autre part, dont six enzymes catalysent des réactions communes (**Figure 6**)(Liu *et al.* 2017). L'approche classique de régulation métabolique basée sur le rétrocontrôle n'est pas suffisante pour correctement comprendre comment les flux sont contrôlés dans la voie. Bien que la leucine, la valine et l'isoleucine exercent effectivement un rétrocontrôle sur les premières enzymes de la voie spécifique, il convient de compléter ce modèle par le concept d'occupation des sites actifs puisque ces enzymes sont partagées pour la synthèse des différents acides aminés. Effectivement la majorité des modèles actuels considèrent qu'une enzyme est dédiée à la transformation d'un substrat en un produit. Or dans certains cas comme dans la voie des BCAA une enzyme peut avoir différents substrats qui ne peuvent être converti en produit qu'à condition que le site catalytique de l'enzyme ne soit pas occupé. Ainsi actuellement, ces mécanismes de régulation restent vagues voire inconnus pour pouvoir comprendre et modéliser de manière quantitative des régulations de voie comme les BCCA dont la topologie est particulière.

1.3.2. Les acétolactate synthases : mécanismes et évolution

Présentes chez tous les organismes en dehors du règne animal, les acétolactate synthases (AHAS) sont des enzymes clés pour le fonctionnement de la

voie des BCAA. Elles font l'objet de nombreuses études depuis les années 1960. Tout d'abord caractérisées d'un point de vue mécanistique (Glover 1962, Gollop *et al.* 1983, Gollop *et al.* 1989), les études récentes se portent, dorénavant, sur des développements à des fins bactéricides et herbicides *via* l'utilisation d'inhibiteurs des AHAS, comme les molécules sulfonylurées ou les imidazolinones (Pue and Guddat 2014, Stetter *et al.* 2012).

Ces enzymes catalysent la première réaction partagée entre la voie de synthèse de l'isoleucine et celles de la valine et de la leucine (**Figure 6**). Elles permettent la conversion de deux molécules de pyruvate en 2-acetolactate + CO₂, ou la transformation d'un pyruvate avec un 2-ketobutyrate en 2-aceto-2-hydroxybutanoate + CO₂ (**Figure 8**). Ces réactions sont effectuées *via* un mécanisme de type « Ping-Pong Bi-Bi », en présence de thiamine diphosphate. Les AHAS vont tout d'abord fixer une molécule de pyruvate, qui sera alors décarboxylée. Ensuite une molécule de pyruvate ou de 2-ketobutyrate est fixée par le complexe pour former l'acétolactate et l'acétohydroxybutyrate respectivement, les deux précurseurs de la voie des BCAA. .

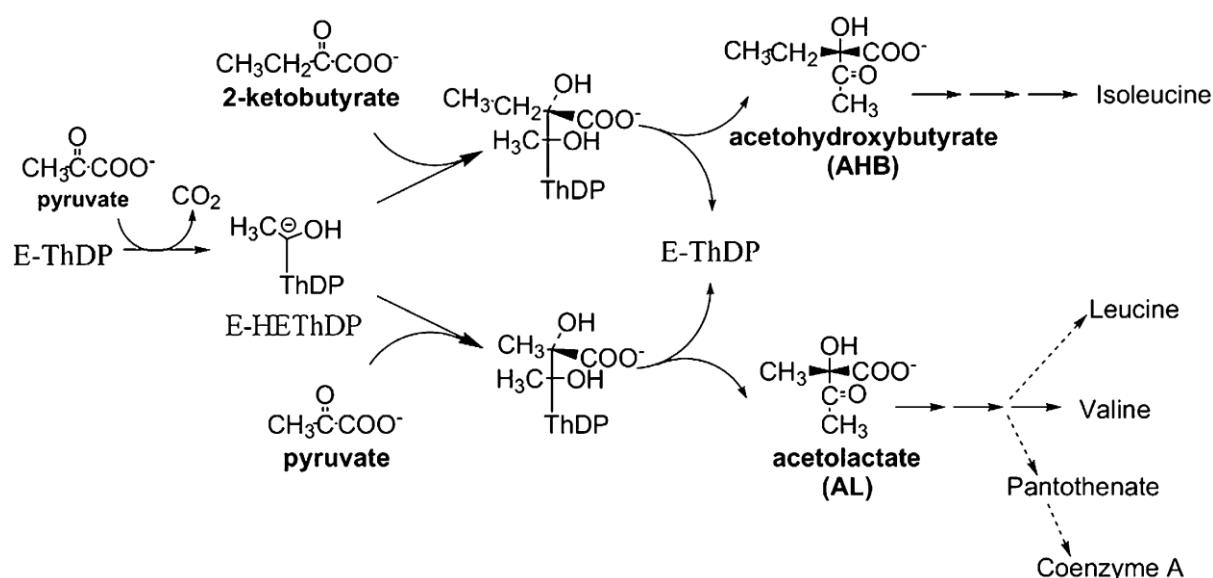


Figure 8: Réactions de biosynthèse catalysées par les AHAS. ThDP : Thiamine diphosphate (extrait de (Vinogradov et al. 2006))

Les AHAS sont composées de 2 sous-unités. Une grande sous-unité catalytique d'environ 60 kDa et d'une petite sous-unité régulatrice approchant les 10kDa (De Felice et al. 1974). Suite à divers mécanismes évolutifs, les AHAS se sont diversifiées et spécialisées. Ainsi, suivant l'espèce étudiée, la composition en AHAS peut légèrement varier. Dans le cas d'*E. coli* K-12 MG1655, trois formes sont présentes (notées AHAS I, AHAS II, et AHAS III) (Vyazmensky et al. 2009). Une analyse approfondie de plus de 21 000 organismes cellulaires a révélé que ces enzymes, bien que différentes, possèdent des séquences d'acides aminés très conservés. Cette similitude a permis de mettre en évidence par un modèle évolutif, une enzyme ancestrale commune aux bactéries qui, suite à des duplications et des délétions de domaine, a conduit aux trois AHAS présentes chez *E. coli* (Liu et al. 2017).

1.3.3. Les AHAS chez *E. coli*

Chez *E. coli*, les trois AHAS sont toutes composées de deux sous-unités codées en opéron, *ilvB* et *ilvN* pour l'AHAS I, *ilvG* et *ilvM* pour l'AHAS II au sein de l'opéron *ilvGMEDA*, et *ilvI* et *ilvH* pour l'AHAS III.

Pour l'AHAS I, l'expression de l'opéron *ilvBN* correspondant est régulé par plusieurs facteurs de transcription selon les conditions environnementales. Ainsi, l'expression de cet opéron est sous la dépendance de la répression catabolique. En absence de glucose, de l'AMP cyclique est synthétisé (Amin and Peterkofsky 1995) et va se complexer avec la protéine CRP (cAMP receptor protein) qui joue le rôle d'un régulateur global. Le complexe ainsi formé va induire, entre autres choses, la transcription de l'opéron *ilvBN* (Friden *et al.* 1984) en particulier lors de phase stationnaire et de croissance sur acétate (Dailey and Cronan 1986). *In vitro*, l'induction par ce facteur de transcription augmente l'expression de l'opéron d'un facteur 7 (Friden *et al.* 1984). Un second mécanisme de régulation de l'expression de cet opéron est associé à la réponse stringente. Cette régulation dépend de la concentration d'une molécule, le (p)ppGpp, qui est une alarmone considérée comme un des régulateurs globaux d'*E. coli* (Magnusson *et al.* 2005). Sa synthèse induit dans la bactérie une « réponse stringente », qui se traduit par l'inhibition rapide de la synthèse des ARN de transfert et ribosomiaux, puis provoque un arrêt de croissance (Cashel and Rudd 1996). Ce mécanisme de régulation s'active suite à différents types de stress. Elle fut tout d'abord décrite comme étant le résultat d'une carence en acides aminés (Haseltine and Block 1973). Cette notion a par la suite été étendue à l'ensemble des carences nutritionnelles (carbone, fer, azote, oxygène, et phosphate) ainsi qu'aux perturbations environnementales (acidification, choc osmotique...) (Battesti and Bouveret 2006, Dalebroux and Swanson 2012, Nazir and Harinarayanan

2016, Potrykus and Cashel 2008, Srivatsan and Wang 2008, Vinella *et al.* 2005). Il est à noter que l'ensemble des gènes ne subissent pas une répression de leur transcription lors de l'augmentation de la concentration intracellulaire en (p)ppGpp. Certaines expressions peuvent au contraire être fortement induites, afin de favoriser des voies de synthèses de précurseurs (tels que les acides aminés) et palier à une carence. C'est le cas de l'opéron *ilvBN* (Durfee *et al.* 2008).

Une fois traduite, IlvB peut être présente dans la cellule sous forme libre ou en complexe avec la petite sous-unité régulatrice, IlvN. La grande sous-unité seule est peu active (Vyazmensky *et al.* 2009) et son activité n'est pas régulée. Une fois en complexe avec l'unité IlvN, son activité est fortement augmentée (facteur 5 (Vyazmensky *et al.* 2009)). De plus, sous cette forme complexée, l'activité de l'enzyme peut être inhibée selon un mécanisme non compétitif par la valine ($K_i = 37,0 \mu\text{M}$) soit par modification de la conformation du complexe soit par la dissociation de la petite sous unité de l'holoenzyme (Vyazmensky *et al.* 2009). Ce mécanisme reste encore à être déterminé. Cette sensibilité induite par IlvN à la valine a conduit à désigner cette petite sous-unité comme une unité régulatrice. Ainsi, l'accumulation de valine dans la cellule exerce un rétrocontrôle sur cette enzyme (Gedi and Yoon 2012).

L'information génétique de l'AHAS II est située sur les gènes *ilvG* et *ilvM*, eux même localisé au sein de l'opéron *ilvGMEDA* (Favre *et al.* 1976). Celui-ci, tout comme *ilvBN*, est régulé par le (p)ppGpp (Durfee *et al.* 2008) et participe donc à la réponse stringente, mais n'est pas régulé au contraire d'*ilvBN* par la répression catabolique. Ceci s'explique notamment du fait qu'en plus de coder pour les deux sous-unités de l'AHAS II, cet opéron code pour trois enzymes de la voie des BCAA, toutes essentielles pour la synthèse des acides aminés branchés (les mutants de délétions *E. coli* MG1655 $\Delta ilvE$, $\Delta ilvD$ et $\Delta ilvA$ ne sont pas capables de pousser en milieu

minimum - Baba et al., 2006). L'opéron *ilvGMEDA* est aussi sous la dépendance du facteur de transcription Lrp (**L**eucine-responsive **R**egulatory **P**rotein) (Rhee et al. 1996). Ce facteur est un régulateur global du métabolisme d'*E. coli* qui agit comme un senseur de la disponibilité en acide aminé dans le milieu, notamment en leucine. Il permet à la bactérie de s'adapter à des carences nutritionnelles en agissant directement comme répresseur ou comme activateur de 10 % des gènes du génome d'*E. coli* (Tani et al. 2002). Dans la cellule, Lrp est présent sous deux formes, Lrp et Lrp-Leu. Sous sa forme Lrp, le régulateur adopte une forme d'hexadecamère (Chen et al. 2001). La présence de leucine dans le milieu va induire la formation d'un complexe octamérique avec la leucine, Lrp-Leu (Chen and Calvo 2002). Le passage entre la forme octamérique et la forme hexadécamérique détermine l'affinité du régulateur transcriptionnel pour l'ADN. La synthèse de la leucine dans la voie des BCAA a donc un rôle majeur à jouer dans le fonctionnement de Lrp. Lors d'une carence en leucine, Lrp active la transcription des gènes de l'opéron *ilvGMEDA*, qui est indispensable dans la voie des BCAA. Une fois traduites, les sous-unités IlvG (grande sous-unité) et IlvM (petite sous-unité) peuvent interagir et constituer l'AHAS II. Contrairement à l'AHAS I, qui utilise préférentiellement deux pyruvates comme substrats, l'AHAS II catalyse majoritairement la condensation d'un pyruvate avec un 2-ketobutyrate (Barak et al. 1987).

La dernière acétolactate synthase est l'AHAS III. Tout comme l'AHAS I, cette enzyme est codée par un petit opéron, nommé *ilvIH*. La transcription de ses gènes est soumise aux mêmes régulations que l'AHAS II, à savoir la réponse stringente *via* la molécule de (p)ppGpp et la concentration en leucine *via* le régulateur Lrp. La première semble cependant agir négativement sur la transcription de l'opéron. Ce résultat, rapporté uniquement dans les travaux de (Baccigalupi et al. 1995) est soumis

néanmoins à questionnement. Plus récemment, les recherches de (Chang *et al.* 2002) n'ont en effet permis de constater qu'une légère diminution de l'expression de l'opéron *ilvIH*. Le rôle de la réponse stringente dans la régulation de cet opéron reste donc à clairement établir. Après traduction de l'opéron, l'association de la grande sous-unité IlvI avec la petite sous-unité IlvH, conduit à la formation de l'AHAS III qui, comme l'AHAS I, est active en absence de valine. L'enzyme catalyse avec une affinité quasi similaire la condensation de deux pyruvates ou d'un pyruvate avec une molécule de 2-ketobutyrate.

Il existe donc trois AHAS chez *E. coli* qui utilisent les mêmes substrats : le pyruvate et/ou le 2-ketobutyrate. L'implication de ces enzymes dans la catalyse des deux réactions de décarboxylation est toutefois différente. Si le mécanisme réactionnel démarre systématiquement avec la fixation d'une molécule de pyruvate, la spécificité pour le second substrat (pyruvate ou 2-ketobutyrate) diffère selon les AHAS. Ainsi l'AHAS I catalyse préférentiellement la condensation de deux pyruvates, l'AHAS II utilise préférentiellement une molécule de 2-ketobutyrate alors que l'AHAS III ne semble pas avoir de préférence de substrats pour l'une ou l'autre de ces molécules (Barak *et al.* 1987). De plus, l'activité spécifique réactionnelle diffère selon les AHAS. L'existence de ces trois isoenzymes soulève quelques questionnements et on peut s'interroger sur le besoin d'*E. coli* de conserver trois AHAS pour se développer de manière optimale ? Une autre interrogation est soulevée par le fait que l'une de ces trois AHAS (en l'occurrence AHAS II) est inactive dans les souches d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique K-12, sans qu'un défaut majeur de croissance soit observé. En effet, le génome de ces souches porte une mutation de type « frameshift » sur le gène *ilvG* (Lawther *et al.* 1981). Le décalage du cadre de lecture qui en découle conduit à l'apparition prématurée d'un codon stop dans la séquence

d'*ilvG* à la 1252^{ème} paire de base du gène (Lawther *et al.* 1982) et par conséquent une protéine *IlvG* tronquée et inactive. Or seule l'AHAS II est insensible à l'inhibition exercée par la valine (Lawther *et al.* 1981). La conséquence expérimentalement observée est l'incapacité des souches d'*E. coli* du groupe phylogénétique K-12 se développer sur milieu minimum enrichi en valine, car l'inhibition des AHAS I et III par la valine génère une pseudo-auxotrophie pour l'isoleucine.

1.3.4. Valine / isoleucine, une synthèse en miroir

Suite à la conversion du pyruvate et du 2-ketobutyrate en acétolactate et 2-aceto-2-hydroxybutanoate par les acétolactates synthases, trois enzymes promiscuitaires, l'hydroxyacide réducto-isomérase (KARI), la dihydroxy-acid déshydratase (DAD) et la transaminase B, vont permettre la formation de la valine et de l'isoleucine. La première réaction de cette partie de la voie métabolique est réalisée par KARI (**Figure 6**). Cette enzyme est codée par le gène *ilvC* qui est l'unique gène de la voie à ne pas être organisé sous forme d'opéron. Pour réaliser la conversion de ses substrats en produits, deux cofacteurs sont nécessaires : du NADPH et du Mg^{2+} . Ainsi après une première étape d'isomérisation du 2-aceto-2-hydroxybutanoate et de l'acétolactate, une deuxième étape de réduction conduite par la réduction du NADPH en $NADP^+$ permet la formation respectivement de 2,3-dihydroxy-3-méthylbutanoate (DHMP) et du 2,3-dihydroxyisovalérate (DHIV) (Tyagi *et al.* 2005)

Les deux réactions enzymatiques restantes nécessaires à l'obtention de la valine et de l'isoleucine sont, tout comme l'AHAS II et la thréonine déaminase, codées sur l'opéron *ilvGMEDA*. DAD est codée par le gène *ilvD*. Il s'agit d'une enzyme dont

le poids moléculaire est de 66 kDa et qui a la particularité d'être une protéine fer/soufre.

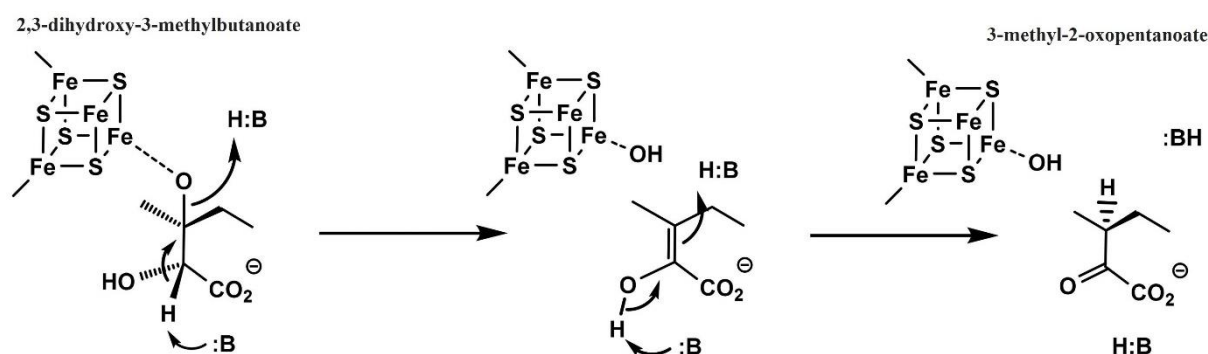


Figure 9 : Mécanisme de transformation du 2,3-dihydroxy-3-méthylbutanoate (DHMP) en 3-méthyl-2-oxopentanoate par la dihydroxy-acide déshydratase (extrait de (Amorim Franco and Blanchard 2017))

L'enzyme est donc à la fois constituée d'une apoenzyme (IlvD) et d'un centre fer-soufre de structure [4Fe-4S] qui va agir comme un acide de Lewis qui va interagir avec le groupe hydroxyle présent en C3. Cette liaison va ainsi générer un dérivé éthylénique par β -élimination qui par tautomérisation (migration d'un atome d'hydrogène accompagnée d'un changement de localisation d'une double liaison) donnera du 3-méthyl-2-oxopentanoate si le substrat de l'enzyme est du DHMP ou du 3-méthyl-2-oxobutanoate si le substrat initial est du DHIV (**Figure 9**). Cette unité catalytique fer-soufre est centrale dans le fonctionnement de la voie des BCAA. Son importance sera décrite dans le **chapitre 1.4**. De plus, bien que dans des conditions de cultures aérobie l'intégralité fonctionnelle de cette enzyme soit préservée, il a toutefois pu être noté que l'enzyme DAD est l'une des enzymes les plus sensibles à l'oxygène chez *E. coli* (Flint *et al.* 1993) ainsi qu'au monoxyde d'azote (NO) (Ren *et al.* 2008). Effectivement, en présence de ces gaz, le cluster [4Fe-4S] se dégrade et conduit à l'inactivation de l'enzyme.

Dans la voie des BCAA, la DAD catalyse la conversion de deux métabolites (**Figure 6**), le 3-méthyl-2-oxopentanoate pour la de synthèse de l'isoleucine et le 3-méthyl-2-oxobutanoate celle de valine. Ce dernier constitue un nœud métabolique puisqu'il peut être orienté soit pour la synthèse de valine, soit dans la voie de synthèse de la leucine ou de celle du pantothénate. Il est aussi à noter qu'aucune autre enzyme ne catalyse ces réactions. Ainsi un mutant dépourvu du gène *ilvD* ne pourra pas synthétiser de valine, de leucine ou isoleucine et ne sera pas en mesure de se développer sur un milieu qui ne comporte pas ces trois acides aminés.

L'étape finale nécessaire à l'obtention de la valine et de l'isoleucine est catalysée par la transaminase B qui est elle aussi une enzyme essentielle à la formation de la leucine. Cette enzyme promiscuitaire d'un poids moléculaire de 32 KDa est codée par le gène *ilvE*. Elle catalyse la réaction de transamination *via* le transfert du groupe amine du L-glutamate sur le C α des trois ceto-acides de la voie, le 4-méthyl-2-oxopentanoate, le 3-méthyl-2-oxobutanoate, et le (S)-3-méthyl-2-oxopentanoate, conduisant à la formation respectivement de la leucine, de la valine, et de l'isoleucine. Enfin, étant une réaction réversible, *E. coli* a la possibilité de palier à une carence en leucine et/ou en pantothénate grâce à l'assimilation de valine extracellulaire. Ainsi dans un milieu appauvri en leucine mais qui contient de l'isoleucine et de la valine la bactérie peut se développer bien que les AHAS et la thréonine deaminase sont inhibées.

1.3.5. La voie de synthèse de la leucine

Interconnectée avec la voie de synthèse de la valine, la formation de la leucine est réalisée par quatre réactions enzymatiques dont la dernière est catalysée par la transaminase B (**Figure 6**) comme mentionné ci-dessus. L'ensemble des gènes de

cette voie est essentiel à la croissance d'*E. coli* sur milieu minimum (Baba et al., 2006). En effet, en l'absence des gènes codant pour l'un de ces enzymes, la bactérie *E. coli* n'est pas capable de se développer sur milieu minimum sans l'ajout de leucine.

Les trois enzymes dédiées spécifiques à la synthèse de la leucine sont toutes organisées au niveau du génome en l'opéron *leuABCD*. Tout comme *ilvGMEDA*, sa transcription est activée par la présence de (p)ppGpp lors du déclenchement de la réponse stringente (Durfee et al. 2008, Reimers et al. 2004). La première étape de cette voie est réalisée par la 2-Isopropylmalate synthase (IPMS) codée par le gène *leuA*. Cette enzyme catalyse la conversion du 3-méthyl-2-oxobutanoate en 2-isopropylmalate, avec l'acétyl-CoA comme co-substrat (Stieglitz and Calvo 1974). Contrairement aux voies de synthèse de la valine et de l'isoleucine qui sont principalement régulées au niveau des AHAS par un mécanisme de rétrocontrôle, la leucine produite va inhiber l'activité de la première enzyme spécifique de sa voie de synthèse à savoir la IPMS. La leucine exerce une inhibition allostérique sur l'activité de l'IPMS (Casey et al. 2013, Fenton 2008). La fixation de leucine conduit à un changement conformationnel de la protéine sans pour autant changer le K_M pour son ligand et seule son activité catalytique sera affectée.

Le 2-isopropylmalate est ensuite isomérisé en 3-isopropylmalate par l'isopropylmalate isomerase (IPMI). Cette hétéroenzyme est composée de 2 sous-unités LeuC et LeuD qui interagissent avec un cluster fer-soufre [4Fe-4S]. Tout comme la DAD, son activité dépend donc de l'intégrité de son centre fer-soufre et s'avère également extrêmement sensible à l'oxygène (Flint et al. 1993, Jang and Imlay 2007). De plus, cette enzyme se comporte aussi comme un acide de Lewis. Ainsi, au cours de la réaction, une première étape de déshydratation pour former le 2-

isopropylmaleate précède une hydratation de cet intermédiaire réactionnel pour former le 3-isopropylmalate.

La troisième étape de biosynthèse de la leucine est réalisée par la 3-isopropylmalate déshydrogénase. Codée par *leuB* au sein de l'opéron *leuABCD*, cette enzyme catalyse la conversion du 3-isopropylmalate en 4-méthyl-2-oxopentanoate grâce à la réduction d'une molécule de NAD^+ en présence d'ions divalents tel que le Mg^{2+} ou le Mn^{2+} et d'un cation K^+ (Wallon *et al.* 1997). Le 4-méthyl-2-oxopentanoate ainsi formé, est ensuite converti par la transaminase B en leucine.

1.4. Une voie étroitement liée au métabolisme du fer :

Hormis quelques exceptions telles que la bactérie lactique *Lactobacillus*, de *Treponema pallidum* (syphilis) et de *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme) qui utilisent du cobalt et du manganèse (Archibald 1983, Posey and Gherardini 2000), le fer est l'un des éléments essentiels à la croissance des bactéries. Il est impliqué dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire en assurant le transfert des électrons au niveau des différents complexes redox (Ingledew and Poole 1984), mais aussi dans la réponse au stress oxydatif (Imlay 2008), dans la réparation de l'ADN, ainsi que dans des catalyses redox et non-redox. Ces fonctions sont vitales pour la bactérie.

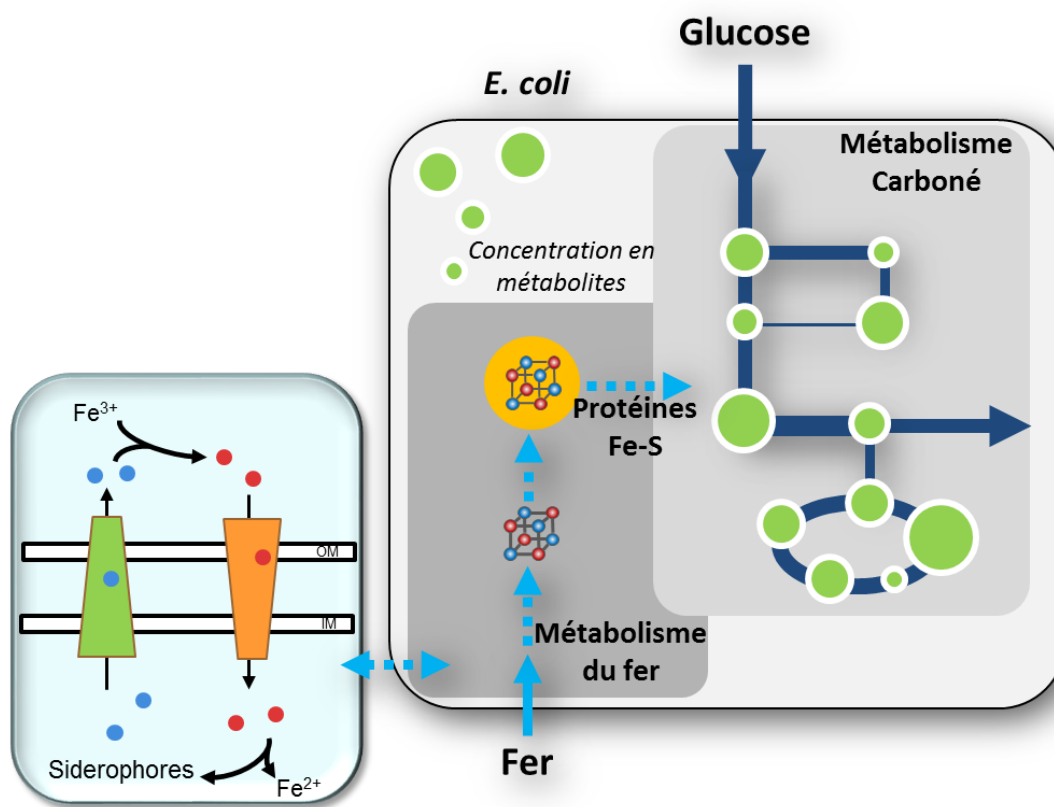


Figure 10 : Représentation schématique de l'imbrication du métabolisme du fer dans le métabolisme carboné

Ainsi, le fer est impliqué dans le métabolisme carboné. Comme expliqué brièvement dans le **chapitre 1.3.4**, certaines enzymes utilisent le fer comme centre catalytique. Chez *E. coli*, 88 protéines fer-soufre ont pu être caractérisées (**Tableau 2**). Cette forte interaction entre le fer et ces différentes enzymes met en évidence le lien étroit entre le métabolisme du fer et le métabolisme carboné chez des microorganismes tel qu'*E. coli* (**Figure 10**). Toutefois cette interaction nécessite en amont la mise en place de plusieurs étapes obligatoires, dont l'assimilation du fer, son internalisation, son stockage et son utilisation.

Tableau 2: Liste des protéines fer-soufre chez *E. coli*

Fonction	Protéine(s) (gène[s])
Transfert d'électron	
	Ferredoxine (fdx, bfd, yfaE)
	Succinate deshydrogenase (<i>sdhB</i>)
	Sulfite reductase (<i>cysI</i>)
	Nitrite réductase (<i>nirB</i>)
	Formate-dependent nitrite reductase (<i>nrfC</i>)
	2,4-Dienoyl-CoA reductase (<i>fadH</i>)
	DMSO reductase (<i>dmsA, dmsB</i>)
	SoxR reductase (<i>rseC, rsxB, rsxC</i>)
	Formate dehydrogenase N (<i>fdnG, fdnH, fdhD</i>)
	Formate dehydrogenase H (<i>fdhF</i>)
	Formate dehydrogenase O (<i>fdoG, fdoH</i>)
	Ferrichrome reductase (<i>fhuF</i>)
	Fuarate reductase (<i>frdB</i>)
	Glutamate synthase (<i>gltB, gltD</i>)
	HCP (<i>hcp</i>)
	HCP reductase (<i>hcr</i>)
	Periplasmic nitrate reductase (<i>napA, napF, napG, napH</i>)
	Respiratory nitrate reductase 1 (<i>narG, narH</i>)
	Respiratory nitrate reductase 2 (<i>nary, narZ</i>)
	NADH-quinone oxidoreductase (<i>nuoB, nuoE, nuoF, nuoG, nuoI</i>)
	Anaerobic glycerol phosphate dehydrogénase (<i>glpB</i>)
	Hydrogenase 1 (<i>hyaA</i>)
	Hydrogenase 2 (<i>hybO, hybA</i>)
	Hydrogenase 3 (<i>hycB, hycF, hycG</i>)
	Hydrogenase 4 (<i>hyfA, hyfH, hyfI, hyfR</i>)
	Xanthine dehydrogenase (<i>xdhC</i>)
	Rieske proteins (<i>yeaW, hcaC</i>)
Assemblage de complexe métallique	
	Scaffold proteins (<i>iscU, nfuA</i>)
	A-type transporteurs (<i>iscA, sufA, erpA</i>)
	Mocofactor biosynthesis protein (<i>moaA</i>)
	SufB (<i>sulfB</i>)
Liaison à l'ADN	
Régulateur d'expression des gènes	
	Fumarate and nitrate reduction regulator (<i>fnr</i>)
	Isc regulator (<i>iscR</i>)

Réparation de l'ADN	Redox-sensitive transcriptional activator (<i>soxR</i>)	
	Transcriptional activator (<i>yeiL</i>)	
	Adenine glycosylase (<i>mutY</i>)	
	Endonuclease III (<i>nth</i>)	
Modification des ARN	RNA 5-methyluridine methyltransferase (<i>rumA</i>)	
	Catalyse redox	
Catalyse à radical SAM	Catalyse à radical SAM	
	Biotin synthase (<i>bioB</i>)	
	Coproporphyrinogen synthase (<i>hemN</i>)	
	Lipoate synthase (<i>lipA</i>)	
	Thiazole biosynthesis proteine (<i>thiH</i>)	
	RNA thiomethyl transferase (<i>miaB</i>)	
	Anaerobic ribonucleotide reductase-activating component (<i>nrdG</i>)	
	Pyruvate-formate lyase-activating component (<i>pflA</i>)	
	Sulfatase maturase (<i>aslB</i>)	
	Methylthio transferase (<i>rimO</i>)	
	Autres	
	4-hydroxy-3methylbut-2-en-1-yl synthase (<i>ispG</i>)	diphosphate
	4-hydroxy-3methylbut-2-enyl reductase (<i>ispH</i>)	diphosphate
	Catalyse non redox	
	Aconitases (<i>acnA</i> , <i>acnB</i>)	
	Fumarases (<i>fumA</i> , <i>fumB</i>)	
	Dihydroxyacid dehydratase (<i>ilvD</i>)	
	Isopropylmalate isomerase (<i>leuC</i>)	
	Quinolinate synthase (<i>nadA</i>)	
	Serine-threonine deaminase (<i>sdaA</i> , <i>sdaB</i>)	
	Serine dehydratase (<i>tdcG</i>)	

- **Captation du fer**

Dans la nature cet oligoélément peut être sous deux états en fonction des conditions environnementales, une forme ferrique oxydée (Fe^{3+}), et une forme

ferreuse réduite (Fe^{2+}). En présence d'oxygène et à pH 7, le Fe^{3+} se complexe principalement sous la forme d'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH})_3$ - $\text{pKs} = 6,3 \times 10^{-38}$ à 25°C). Or, cet état ne permet pas aux microorganismes de l'assimiler. Seule la forme Fe^{2+} reste en solution tout en pouvant être oxydée en Fe^{3+} dans ces conditions. Ainsi, la faible solubilité de cet élément peut entraîner un problème de disponibilité et d'accessibilité pour les microorganismes (Abdul-Tehrani *et al.* 1999). Nous allons voir dans ce qui suit les moyens développés par différentes *E. coli* pour capter, assimiler et utiliser le fer disponible dans leur environnement.

Une bactérie a besoin d'une concentration intracellulaire en fer d'approximativement 10^{-6} M (Andrews *et al.* 2003). *E. coli* possède divers mécanismes pour capter et assimiler le fer (**Figure 11**), ce qui lui permet de pallier à la faible biodisponibilité de cet oligoélément. Le premier moyen est une voie passive. Les ions ferreux passent du milieu extracellulaire au périplasme par des pores présents sur la membrane externe de la bactérie (Porcheron *et al.* 2013). Ce processus ne nécessite pas d'apport d'énergie mais est peu efficace. Le transport vers le cytoplasme est ensuite réalisé par le transporteur EfeUOB (transporteur passif exprimé lors de limitation en fer) ou par des transporteurs actifs codés par les gènes *feoA*, *feoB* et *feoC* et qui utilisent du GTP (Andrews *et al.* 2003, Grosse *et al.* 2006). Un second moyen consiste à capter et à assimiler le fer repose sur l'utilisation de sidérophores. Il s'agit d'un processus actif dont le mode de fonctionnement chez *E. coli* est décrit ci-dessous.

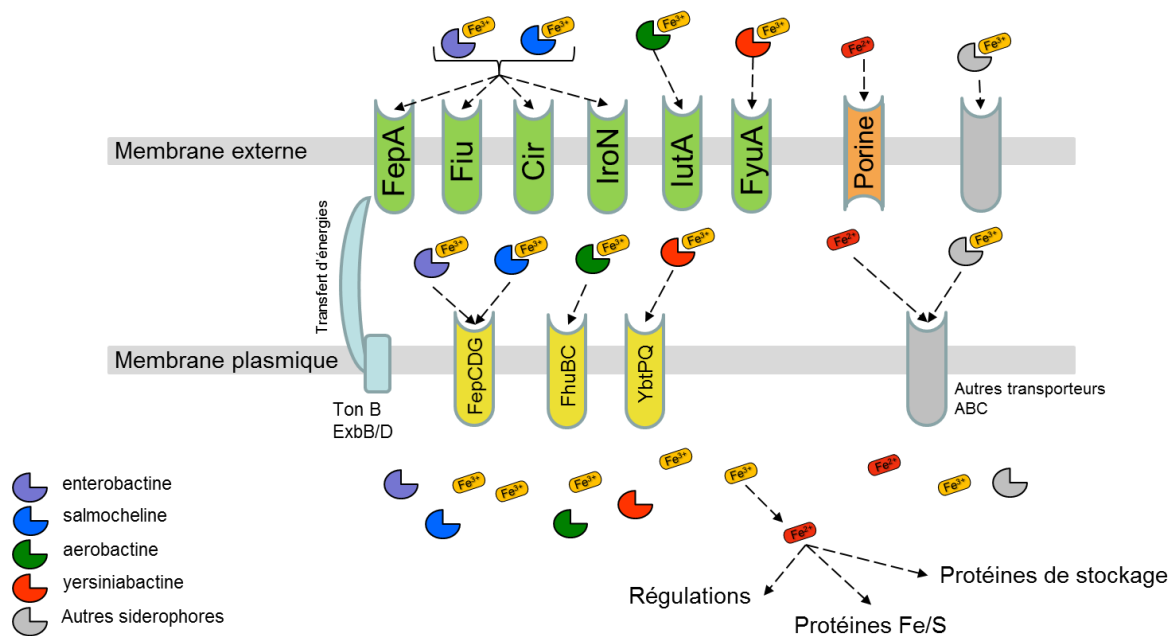


Figure 11 : Mécanisme d'assimilation sur fer chez *E. coli*

1.4.1. Les siderophores

Ces molécules sont synthétisées par les bactéries, les levures et les plantes. Capables de former des complexes stables avec des ions ferriques (Fe^{3+}), ce sont des chélateurs qui stabilisent la forme ionisée de cet oligoélément. Elles sont produites lorsque la concentration en fer dans l'environnement de la bactérie est faible. Les siderophores sont alors sécrétés dans le milieu extracellulaire *via* des mécanismes encore mal caractérisés à l'heure actuelle et vont permettre de capter le Fe^{3+} à des concentrations extrêmement faibles. Ils ont en effet, une affinité élevée pour le fer sous sa forme ferrique, Fe^{3+} : $K_d = 10^{-23}$ M à 10^{-52} M (Watts *et al.* 2012). Le complexe siderophore/ Fe^{3+} est ensuite internalisé grâce à des transporteurs spécifiques énergies dépendants présents sur la membrane externe tels que FepA, Fiu, Cir, IronN *etc.* (**Figure 11**). L'énergie nécessaire à ce transport est obtenue par l'intermédiaire du complexe TonB-ExbB-ExbD. Cette structure, composée de trois protéines de la membrane interne (TonB, ExbB et ExbD) (Celia *et al.* 2016) permet, sous l'action de

la force proton-motrice de la membrane interne, de générer et transmettre au récepteur membranaire l'énergie nécessaire à l'internalisation dans le périplasme du complexe sidérophore/ Fe^{3+} (Andrews *et al.* 2003). Ce processus permet donc à la bactérie d'internaliser le fer quand sa disponibilité est faible, et d'avoir un apport suffisant pour son développement.

Quatre sidérophores peuvent être produits par *E. coli* : l'entérobactine, la salmocheline, l'aérobactine, et la yersiniabactine (Andrews *et al.* 2003) (**Figure 12**). Le premier est produit par la quasi-totalité des souches. Les trois autres sont principalement retrouvés dans le groupe phylogénétique B2.

Chacun de ces sidérophores possède ses propres caractéristiques physico-chimiques et ses propres modalités d'action. Par exemple, l'entérobactine et l'aérobactine sont produits principalement en conditions acides, alors que la yersiniabactine est produite à pH neutre (Valdebenito *et al.* 2006).

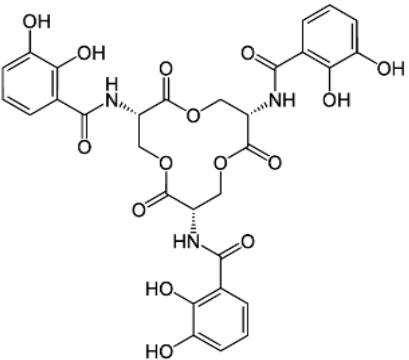
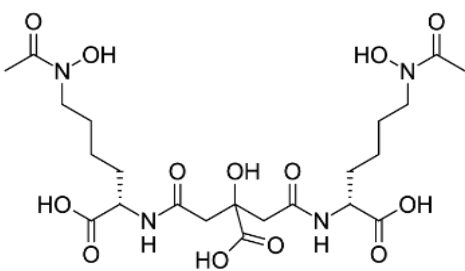
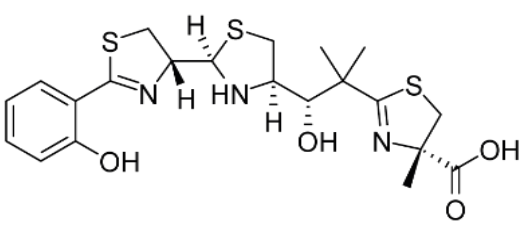
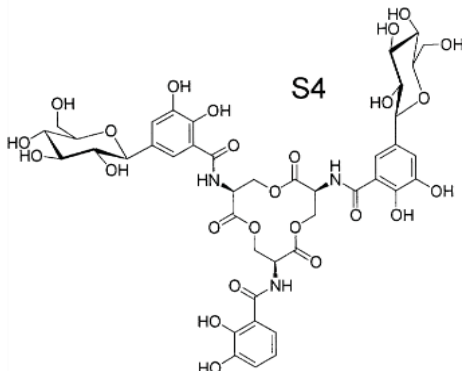
Entérobactine	Aérobactine
	
Yersiniabactine	Salmocheline S4
	

Figure 12: Les sidérophores produits pas *E. coli*

1.4.2. Synthèses des sidérophores

Capter le fer par l'intermédiaire des sidérophores n'est pas anodin pour *E. coli*. Il s'agit d'un mécanisme complexe qui nécessite la contribution de plusieurs intermédiaires enzymatiques, aussi bien pour la biosynthèse du sidérophore, son excrétion ou son internalisation par les complexes sidérophore/ Fe^{3+} . Deux voies sont nécessaires à leur synthèse selon la famille chimique à laquelle ils appartiennent:

- La famille des catécholates est composée de l'entérobactine et de la salmocheline. Elle requiert la présence d'enzymes NRPS (**n**on**r**ibosomal **p**eptide **s**ynthase) (Miethke and Marahiel 2007). Ces dernières sont des

complexes enzymatiques, des mégasynthèses, composées de trois domaines. Un domaine de thiolation (domaine T ou PCP pour Peptidyl Carrier Protein) qui maintient le peptide lors de l'élongation, un domaine d'adénylation (domaine A), qui permet la fixation d'un acide aminé et son activation grâce à une réaction d'adénylation, et un domaine de condensation (domaine C) qui va assurer la formation de la liaison peptidique avec l'oligomère (Marahiel 2016).

- La famille des phénolates (yersiniabactine) nécessite en plus de la machinerie enzymatique NRPS, la machinerie PKS (**P**oly**k**etide **s**ynthase). Ces mégasynthèses permettent d'assembler des monomères dérivés de l'acides malonique. Tout comme les NRPS, elles possèdent aussi trois domaines principaux distincts. Un domaine de thiolation (domaine ACP), un domaine d'activation (domaine AT) ainsi qu'un domaine kétosynthase (domaine KS) qui condense le substrat sur l'oligomère (Pfeifer *et al.* 2003).

1.4.3. Exportation des sidérophores

Une fois synthétisés, les sidérophores doivent être excrétés dans le milieu extracellulaire, pour assurer la captation du fer. Chez *E. coli*, l'exportation de l'entérobactine est réalisée par la protéine EntS, qui appartient à la famille des MFS (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily) (Furrer *et al.* 2002, Pao *et al.* 1998). Les MFS font partie d'une des familles de transporteurs membranaires les plus répandus. On les retrouve aussi bien chez les archées et les bactéries que chez les eucaryotes. Composées de 17 sous-familles avec des fonctions différentes (uniport, symport, antiport, *etc.*), elles permettent de transporter des molécules comme des sucres, des acides aminés, des

nucléosides et aussi donc l'entérobactine. Dans le cas de ce sidérophore, l'export est réalisé par un transporteur antiport proton/substrat. Les autres sidérophores possèdent aussi leur système d'exportation. Ils sont codés par des séquences présentes sur des îlots de pathogénicité (Schubert *et al.* 2002, Sorsa *et al.* 2003). Ces îlots sont des fragments d'ADN double brins obtenus par transfert horizontal, intégré dans le génome et qui codent entre autres pour des facteurs de virulence. C'est ainsi qu'*E. coli* a pu acquérir le MFS YbtX issu de *Yersinia pestis* pour l'export de la yersiniabactine (Fetherston *et al.* 1999), tout comme IroC de *Salmonella typhi* pour l'export de la salmochéline (Baumler *et al.* 1996, Dozois *et al.* 2003).

- **Assimilation des complexes sidérophore/fer et stockage**

1.4.4. Assimilation des complexes

Suite à la fixation des ions Fe^{3+} sur les sidérophores, le complexe ainsi formé va être internalisé par la bactérie. Pour cela des récepteurs membranaires (**Figure 11**) sont présents sur la membrane externe d'*E. coli*. Chacun d'eux a besoin d'énergie pour fonctionner. Pour cela, la force proton-motrice de la membrane interne, *via* la protéine TonB, est transférée grâce au complexe [ExbB-ExbD] aux différents récepteurs membranaires (Garcia-Herrero *et al.* 2007). Les complexes Fe^{3+} -sidérophores sont alors internalisés dans le périplasme avant d'être pris en charge par des transporteurs ABC (**A**TP **B**inding **C**assette) pour passer dans le cytoplasme d'*E. coli*.

1.4.5. Devenir du fer intracellulaire

Le fer intracellulaire se présente sous deux états possibles : libre (Fe^{2+}) ou complexé avec un chélateur. Le fer des complexes sidérophore- Fe^{3+} va être libéré soit par protéolyse, soit par des réactions de réduction spécifiques aux sidérophores, permettant la transition Fe^{3+} vers Fe^{2+} et la libération du fer (Miller 2002). Sous cette forme, il peut se complexer avec des senseurs de la teneur intracellulaire en Fe^{2+} , tel que le système FUR (**F**erric **U**ptake **R**egulation). Le système FUR régule un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme de l'assimilation du fer, et joue un rôle central dans le métabolisme du fer. Il induit l'expression des gènes de biosynthèse des sidérophores, ainsi que celle des gènes associés à la biosynthèse des transporteurs de ces derniers. FUR est un répresseur transcriptionnel actif une fois complexé avec du Fe^{2+} . Sous cette forme, il intervient quand la concentration intracellulaire en Fe^{2+} est élevée.

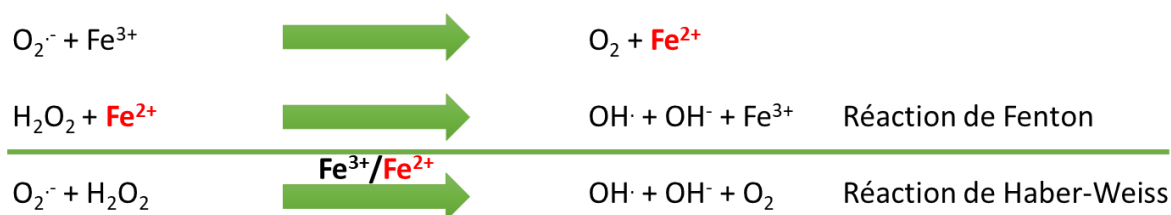


Figure 13: Réaction de formation des radicaux libres

Le fer libre peut être aussi problématique pour *E. coli*. En effet, celui-ci peut réagir avec du peroxyde d'hydrogène, et produire, par réaction de Fenton, des radicaux hydroxyles (**Figure 13**) (Keyer *et al.* 1995)Erreur ! Source du renvoi introuvable.. Ils sont regroupés sous le terme de ROS (**R**eactive **O**xygen **S**pecies) dont l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) font partie. Ces radicaux sont extrêmement réactifs et nocifs pour la cellule. Ils interagissent avec la

plupart des molécules qui composent la structure et le fonctionnement de la bactérie tels que l'ADN, les protéines, les lipides, les acides aminés en arrachant soit un électron soit un atome d'hydrogène (Gutteridge 1984, Keyer *et al.* 1995). *E. coli* a donc mis en place différentes stratégies pour lutter contre ces stress oxydatifs. La première est une régulation de la quantité intracellulaire de ces ROS par l'induction de deux types d'enzymes : les superoxydes dismutases (SOD) et les catalases. Les SOD vont catalyser la transformation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène, qui sera à son tour transformé par les catalases en $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Chiang and Schellhorn 2012).

Un deuxième moyen consiste à éviter la formation des ROS en limitant la concentration en fer libre dans la cellule. Ainsi, celui-ci est stocké sous forme de complexes avec des protéines de stockage, les bactérioferritines. Ces dernières sont capables de stocker en leur centre près de 2000 atomes de fer Fe^{2+} (Hudson *et al.* 1993). Sachant qu'*E. coli* possède $2 \cdot 10^5$ atomes de fer par cellule (Finney and O'Halloran 2003), cela constitue une réserve conséquente en fer pour la cellule. Cette réserve permet ainsi aux bactéries, en plus de limiter les ROS, de pouvoir pallier à une éventuelle carence en fer.

Enfin, le fer peut interagir avec un atome de soufre pour former des complexes Fe-S, notés $[n\text{Fe}-m\text{S}]$, n et m étant respectivement le nombre d'atome de fer et de soufre impliqué dans ces complexes. Ils existent dans la cellule principalement sous formes de $[\text{Fe-S}]$, $[2\text{Fe-2S}]$ et $[4\text{Fe-4S}]$. Ces complexes Fe-S sont incorporés à des protéines et participent à la formation de leur site actif. Ces protéines fer-soufre exercent diverses fonctions dans la bactérie comme indiqué ci-dessus (Tableau 2): senseurs dans des processus de régulation, transporteurs d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire, catalyseurs redox et non-redox, et stabilisateurs de protéines (Beinert *et al.* 1997, Beinert and Kiley 1999). Pour former ces structures protéiques,

trois grands complexes de maturation existent, ayant chacun un rôle spécifique au sein de la cellule :

1) L'opéron Isc (Iron **S**ulfur **C**luster) est composé de 8 gènes (*iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *hscA*, *hscB*, *fdx*, et *iscX*), et code pour le système principal de biosynthèse des centres [Fe-S]. La délétion du gène *iscS* chez *E. coli*, provoque un ralentissement de la croissance de la bactérie en milieu riche (Tan *et al.* 2009).

2) l'opéron Suf (**S**UIFur mobilization) est composé de 6 gènes (*sufA*, *sufB*, *sufC*, *sufD*, *sufS*, *sufE*), et est essentiellement exprimé dans des conditions de stress oxydatif et de carence en fer (Nachin *et al.* 2003, Outten *et al.* 2004).

3) enfin l'opéron CSD (**C**ystéine **S**ulfinat **D**esulfinate) est un complexe de maturation qui a été récemment caractérisé (Loiseau *et al.* 2005). Il est composé de seulement deux gènes (*csdA* et *csdE*) et est spécifique de la biosynthèse de centres [4Fe-4S] pour la quinolinate synthase.

- **Utilisation du fer intracellulaire : Les protéines fer-soufre dans le métabolisme central carboné**

Ici, le métabolisme carboné central est défini comme l'ensemble des réactions de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates, du cycle de Krebs, des voies de synthèse des acides aminés et des vitamines, et des voies fermentaires. Chez *E. coli*, 88 protéines fer-soufre ont pu être caractérisées (**Tableau 2**) dont 11 sont impliquées dans des réactions catalytiques du métabolisme carboné central :

- Cycle de Krebs : la fumarase A, la fumarase B, l'aconitase A, l'aconitase B, et la succinate déshydrogénase
- Métabolisme fermentaire : la fumarate réductase et la pyruvate-formate lyase participent au métabolisme fermentaire

- Voie des BCAA : la dihydroxy-acide déshydratase et l'isopropylmalate isomerase
- Autre voie de synthèse des acides aminés et vitamines : la glutamate synthase et la biotine synthase

Dans la mesure où la pyruvate formate lyase et la fumarate réductase sont inactives en présence d'O₂, seules 9 enzymes fer-soufre sont actives dans le métabolisme carboné en condition aérobie. Celles-ci réalisent différentes réactions biochimiques selon différents mécanismes catalytiques :

1) la réaction de déshydratation réalisée par les déshydratases comme la DAD ou l'aconitase, repose sur une catalyse non-redox impliquant un acide de Lewis. Le complexe [4Fe-4S] de ces enzymes joue le rôle d'un tel acide. Une de ses orbitales pouvant accepter un doublet électronique, il peut se lier au substrat de la réaction, stabiliser l'état intermédiaire et catalyser la transformation (Flint *et al.* 1993).

2) Les catalyses redox, elles peuvent se réaliser grâce à des enzymes comme la biotine synthase, où un centre [4Fe-4S] de la superfamille des radical-SAM (**S**-Adénosyl-**M**éthionine) va provoquer la réduction puis la lyse de la SAM et générer la formation d'un radical. Ce radical sera ensuite impliqué dans l'activation du substrat à transformer (Lill 2009).

Une interconnexion directe entre le métabolisme central carboné et le métabolisme du fer peut donc être identifiée au niveau de 9 enzymes. Deux d'entre elles (la DAD (4.2.1.9) et l'isopropylmalate déshydrogénase (4.2.1.33)) catalysent des réactions de la voie des BCAA (figure 5) et constituent un point d'interconnexion métabolique entre cette voie et le métabolisme du fer.

- **La voie des BCAA : un maillon qui relie métabolisme du fer et métabolisme carboné chez *E. coli* ?**

Récemment, Tan et ses collaborateurs ont montré que le fer a un impact direct sur le métabolisme central, et tout particulièrement sur la voie métabolique de biosynthèse des BCAA (Tan *et al.* 2009). En effet, des doubles mutants *iscA/sufA* (deux gènes impliqués respectivement dans les systèmes de complexation Fe-S ISC et SUF, les deux principaux systèmes de maturation de centre Fe-S chez *E. coli*) présentent une auxotrophie pour la synthèse de la valine, de la leucine, et de l'isoleucine. L'ajout dans le milieu de culture des trois acides aminés permet de restaurer la croissance. De plus, une diminution très significative de la quantité de ces enzymes chez le double mutant a été observée par rapport à la souche sauvage. Une confirmation de ces résultats a été apportée par (Macomber and Imlay 2009), qui ont montré qu'un excès de cuivre, qui déstabilise les centres [Fe-S] des enzymes fer-soufre, bloque le fonctionnement de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés.

1.5. Objectifs de la thèse

Les *E. coli* K-12 et plus particulièrement la souche MG1655 font partie des principaux modèles d'étude en laboratoire au niveau fondamental, notamment au niveau de la compréhension des régulations métaboliques, enzymatiques, génétiques, *etc.* Les objectifs de la thèse s'articulent donc essentiellement autour de la régulation métabolique à l'échelle cellulaire (transition glucose/acétate) et à une échelle plus locale (régulation de la voie des BCAA). Sur le premier volet, il s'agit de mieux comprendre le métabolisme de l'acétate au cours de la phase de croissance sur glucose et revisiter le modèle métabolique admis jusqu'à présent. Sur le second

volet, il s'agit de mieux comprendre comment la bactérie est capable de compenser et par quel moyen, l'absence d'une enzyme clef dans une voie métabolique causée par mutation génétique ponctuelle. Sur les deux volets, l'objectif est donc d'appréhender les mécanismes de régulation métabolique qui contribue à la robustesse du fonctionnement du métabolisme. Plus spécifiquement, les travaux de ce travail de thèse visent à répondre aux questions suivantes :

- L'acétate excrété pendant la phase de croissance sur glucose par *E. coli*, est-il un simple déchet du métabolisme que la cellule utilisera une fois le glucose épuisé ou au contraire, a-t'il un rôle métabolique pendant cette phase de croissance ?
- La mutation génétique dans *ilvG* se répercute-t-elle plus largement sur le niveau d'expression des autres gènes de l'opéron et a-t-elle un impact sur le fonctionnement global de la voie au-delà même de la réaction normalement catalysée par *IlvG*?
- Existent-ils - et si oui quelle est la nature - des mécanismes de régulation compensant l'absence d'activité de l'AHAS II ?
- Si la voie des BCAA apparaît comme interconnectée avec le métabolisme du fer, quelles peuvent être les conséquences métaboliques à une limitation - ou une carence - sur son fonctionnement ?

Abdel-Hamid, A. M., M. M. Attwood and J. R. Guest (2001). "Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*." Microbiology (Reading) **147**(Pt 6): 1483-1498.

Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest and S. C. Andrews (1999). "Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient." J Bacteriol **181**(5): 1415-1428.

Amin, N. and A. Peterkofsky (1995). "A dual mechanism for regulating cAMP levels in *Escherichia coli*." J Biol Chem **270**(20): 11803-11805.

Amorim Franco, T. M. and J. S. Blanchard (2017). "Bacterial Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Structures, Mechanisms, and Drugability." Biochemistry **56**(44): 5849-5865.

Andersen, D. C., J. Swartz, T. Ryll, N. Lin and B. Snedecor (2001). "Metabolic oscillations in an *E. coli* fermentation." Biotechnol Bioeng **75**(2): 212-218.

Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 215-237.

Archibald, F. (1983). "*Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron." FEMS Microbiology Letters **19**(1): 29-32.

Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.

Baccigalupi, L., R. Marasco, E. Ricca, M. De Felice and M. Sacco (1995). "Control of *ilvH* transcription during amino acid downshift in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett **131**(1): 95-98.

Barak, Z., D. M. Chipman and N. Gollop (1987). "Physiological implications of the specificity of acetohydroxy acid synthase isozymes of enteric bacteria." J Bacteriol **169**(8): 3750-3756.

Battesti, A. and E. Bouveret (2006). "Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism." Mol Microbiol **62**(4): 1048-1063.

Baumler, A. J., R. M. Tsolis, A. W. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic and F. Heffron (1996). "Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*." Gene **183**(1-2): 207-213.

Beinert, H., R. H. Holm and E. Munck (1997). "Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures." Science **277**(5326): 653-659.

Beinert, H. and P. J. Kiley (1999). "Fe-S proteins in sensing and regulatory functions." Curr Opin Chem Biol **3**(2): 152-157.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-1462.

Brenner, D. J., B. R. Davis, A. G. Steigerwalt, C. F. Riddle, A. C. McWhorter, S. D. Allen, J. J. Farmer, Y. Saitoh and G. R. Fanning (1982). "Atypical Biogroups of *Escherichia-Coli* Found in Clinical Specimens and Description of *Escherichia-Hermannii* Sp-Nov." Journal of Clinical Microbiology **15**(4): 703-713.

Brenner, D. J., A. C. McWhorter, J. K. Knutson and A. G. Steigerwalt (1982). "*Escherichia vulneris*: a new species of Enterobacteriaceae associated with human wounds." J Clin Microbiol **15**(6): 1133-1140.

Brown, T. D., M. C. Jones-Mortimer and H. L. Kornberg (1977). "The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*." J Gen Microbiol **102**(2): 327-336.

Calhoun, D. H., R. A. Rimerman and G. W. Hatfield (1973). "Threonine deaminase from *Escherichia coli*. I. Purification and properties." J Biol Chem **248**(10): 3511-3516.

Casey, A. K., E. L. Schwalm, B. N. Hays and P. A. Frantom (2013). "V-type allosteric inhibition is described by a shift in the rate-determining step for alpha-isopropylmalate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*." Biochemistry **52**(39): 6737-6739.

Cashel, M. and K. Rudd (1996). The stringent response. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. **2**: 1410-1438.

Castano-Cerezo, S., J. M. Pastor, S. Renilla, V. Bernal, J. L. Iborra and M. Canovas (2009). "An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*." Microb Cell Fact **8**: 54.

Castellani, A. and A. J. Chalmers (1919). Manual of tropical medicine. London, Baillière, Tindall and Cox.

Celia, H., N. Noinaj, S. D. Zakharov, E. Bordignon, I. Botos, M. Santamaria, T. J. Barnard, W. A. Cramer, R. Lloubes and S. K. Buchanan (2016). "Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction." Nature **538**(7623): 60-65.

Chang, D. E., D. J. Smalley and T. Conway (2002). "Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model." Mol Microbiol **45**(2): 289-306.

Chang, Y. Y., A. Y. Wang and J. E. Cronan, Jr. (1994). "Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the rpoS(katF) gene." Mol Microbiol **11**(6): 1019-1028.

Changeux, J. P. (1961). "The feedback control mechanisms of biosynthetic L-threonine deaminase by L-isoleucine." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **26**: 313-318.

Chaudhuri, R. R. and I. R. Henderson (2012). "The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny." Infect Genet Evol **12**(2): 214-226.

Chen, S. and J. M. Calvo (2002). "Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers." J Mol Biol **318**(4): 1031-1042.

Chen, S., M. H. Rosner and J. M. Calvo (2001). "Leucine-regulated self-association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*." J Mol Biol **312**(4): 625-635.

Chevrette, M. G., K. Gutierrez-Garcia, N. Selem-Mojica, C. Aguilar-Martinez, A. Yanez-Olvera, H. E. Ramos-Aboites, P. A. Hoskisson and F. Barona-Gomez (2020). "Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria." Nat Prod Rep **37**(4): 566-599.

Chiang, S. M. and H. E. Schellhorn (2012). "Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria." Arch Biochem Biophys **525**(2): 161-169.

Dailey, F. E. and J. E. Cronan, Jr. (1986). "Acetohydroxy acid synthase I, a required enzyme for isoleucine and valine biosynthesis in *Escherichia coli* K-12 during growth on acetate as the sole carbon source." J Bacteriol **165**(2): 453-460.

Dalebroux, Z. D. and M. S. Swanson (2012). "ppGpp: magic beyond RNA polymerase." Nat Rev Microbiol **10**(3): 203-212.

De Felice, M., J. Guardiola, B. Esposito and M. Iaccarino (1974). "Structural genes for a newly recognized acetolactate synthase in *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **120**(3): 1068-1077.

De Felice, M., M. Levinthal, M. Iaccarino and J. Guardiola (1979). "Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli* K-12." Microbiol Rev **43**(1): 42-58.

Dinclaux, M., E. Cahoreau, P. Millard, F. Letisse and G. Lippens (2020). "Increasing field strength versus advanced isotope labeling for NMR-based fluxomics." Magn Reson Chem **58**(4): 305-311.

Dozois, C. M., F. Daigle and R. Curtiss, 3rd (2003). "Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 247-252.

Durfee, T., A. M. Hansen, H. Zhi, F. R. Blattner and D. J. Jin (2008). "Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*." J Bacteriol **190**(3): 1084-1096.

Eisenstein, E. (1991). "Cloning, expression, purification, and characterization of biosynthetic threonine deaminase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **266**(9): 5801-5807.

El-Mansi, M., A. J. Cozzzone, J. Shiloach and B. J. Eikmanns (2006). "Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate." Curr Opin Microbiol **9**(2): 173-179.

Enjalbert, B., M. Coccagn-Bousquet, J. C. Portais and F. Letisse (2015). "Acetate Exposure Determines the Diauxic Behavior of *Escherichia coli* during the Glucose-Acetate Transition." J Bacteriol **197**(19): 3173-3181.

Enjalbert, B., F. Letisse and J. C. Portais (2013). "Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*." Metabolites **3**(3): 820-837.

Enjalbert, B., P. Millard, M. Dinclaux, J. C. Portais and F. Letisse (2017). "Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway." Sci Rep **7**: 42135.

Farmer, J. J., 3rd, G. R. Fanning, B. R. Davis, C. M. O'Hara, C. Riddle, F. W. Hickman-Brenner, M. A. Asbury, V. A. Lowery, 3rd and D. J. Brenner (1985). "*Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens." J Clin Microbiol **21**(1): 77-81.

Favre, R., A. Wiater, S. Puppo and M. Iaccarino (1976). "Expression of a valine-resistant acetolactate synthase activity mediated by the *ilv O* and *ilv G* genes of *Escherichia coli* K-12." Mol Gen Genet **143**(3): 243-252.

Fenton, A. W. (2008). "Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life'." Trends Biochem Sci **33**(9): 420-425.

Fetherston, J. D., V. J. Bertolino and R. D. Perry (1999). "YbtP and YbtQ: two ABC transporters required for iron uptake in *Yersinia pestis*." Mol Microbiol **32**(2): 289-299.

Finney, L. A. and T. V. O'Halloran (2003). "Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors." Science **300**(5621): 931-936.

Flint, D. H., M. H. Emptage, M. G. Finnegan, W. Fu and M. K. Johnson (1993). "The role and properties of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* dihydroxy-acid dehydratase." J Biol Chem **268**(20): 14732-14742.

Friden, P., P. Tsui, K. Okamoto and M. Freundlich (1984). "Interaction of cyclic AMP receptor protein with the *ilvB* biosynthetic operon in *E. coli*." Nucleic Acids Res **12**(21): 8145-8160.

Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard and M. A. McIntosh (2002). "Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter." Mol Microbiol **44**(5): 1225-1234.

Garcia-Herrero, A., R. S. Peacock, S. P. Howard and H. J. Vogel (2007). "The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins." Mol Microbiol **66**(4): 872-889.

Gedi, V. and M. Y. Yoon (2012). "Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors--a summary of their structure, biological activity and current status." FEBS J **279**(6): 946-963.

Glover, S. (1962). "Valine-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12." Genetics Research **3**(3): 448-460.

Gollop, N., D. M. Chipman and Z. Barak (1983). "Inhibition of acetohydroxy acid synthase by leucine." Biochim Biophys Acta **748**(1): 34-39.

Gollop, N., B. Damri, Z. Barak and D. M. Chipman (1989). "Kinetics and mechanism of acetohydroxy acid synthase isozyme III from *Escherichia coli*." Biochemistry **28**(15): 6310-6317.

Gray, C. H. and E. L. Tatum (1944). "X-Ray Induced Growth Factor Requirements in Bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **30**(12): 404-410.

Grimminger, H., I. Rahimi-Laridjani, K. Koerner and F. Lingens (1973). "Purification of threonine deaminase from *Escherichia coli*." FEBS Lett **35**(2): 273-275.

Grosse, C., J. Scherer, D. Koch, M. Otto, N. Taudte and G. Grass (2006). "A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*." Mol Microbiol **62**(1): 120-131.

Gutteridge, J. M. (1984). "Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide." FEBS Lett **172**(2): 245-249.

Haseltine, W. A. and R. Block (1973). "Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(5): 1564-1568.

Hayashi, K., N. Morooka, Y. Yamamoto, K. Fujita, K. Isono, S. Choi, E. Ohtsubo, T. Baba, B. L. Wanner, H. Mori and T. Horiuchi (2006). "Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110." Mol Syst Biol **2**: 2006 0007.

Huang, F., G. Coppola and D. H. Calhoun (1992). "Multiple transcripts encoded by the *ilvGMEDA* gene cluster of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **174**(15): 4871-4877.

Hudson, A. J., S. C. Andrews, C. Hawkins, J. M. Williams, M. Izuhara, F. C. Meldrum, S. Mann, P. M. Harrison and J. R. Guest (1993). "Overproduction, purification and characterization of the *Escherichia coli* ferritin." Eur J Biochem **218**(3): 985-995.

Huys, G., M. Cnockaert, J. M. Janda and J. Swings (2003). "*Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children." Int J Syst Evol Microbiol **53**(Pt 3): 807-810.

- Imlay, J. A. (2008). "Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide." Annu Rev Biochem **77**: 755-776.
- Ingledew, W. J. and R. K. Poole (1984). "The respiratory chains of *Escherichia coli*." Microbiol Rev **48**(3): 222-271.
- Jang, S. and J. A. Imlay (2007). "Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes." J Biol Chem **282**(2): 929-937.
- Jensen, K. F. (1993). "The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels." J Bacteriol **175**(11): 3401-3407.
- Jensen, K. F., F. Bonekamp and P. Poulsen (1986). "Attenuation at nucleotide biosynthetic genes and amino acid biosynthetic operons of *Escherichia coli*." Trends in Biochemical Sciences **11**(9): 362-365.
- Keyer, K., A. S. Gort and J. A. Imlay (1995). "Superoxide and the production of oxidative DNA damage." J Bacteriol **177**(23): 6782-6790.
- Khersonsky, O. and D. S. Tawfik (2010). "Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective." Annu Rev Biochem **79**(1): 471-505.
- Kotte, O., J. B. Zaugg and M. Heinemann (2010). "Bacterial adaptation through distributed sensing of metabolic fluxes." Mol Syst Biol **6**: 355.
- Kozlowski, L. P. (2017). "Proteome-pl: proteome isoelectric point database." Nucleic Acids Res **45**(D1): D1112-D1116.
- Kumari, S., R. Tishel, M. Eisenbach and A. J. Wolfe (1995). "Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **177**(10): 2878-2886.
- Lawther, R. P., D. H. Calhoun, C. W. Adams, C. A. Hauser, J. Gray and G. W. Hatfield (1981). "Molecular basis of valine resistance in *Escherichia coli* K-12." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 922-925.
- Lawther, R. P., D. H. Calhoun, J. Gray, C. W. Adams, C. A. Hauser and G. W. Hatfield (1982). "DNA sequence fine-structure analysis of *ilvG* (*IlvG*+) mutations of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **149**(1): 294-298.
- Lill, R. (2009). "Function and biogenesis of iron-sulphur proteins." Nature **460**(7257): 831-838.
- Liu, M., T. Durfee, J. E. Cabrera, K. Zhao, D. J. Jin and F. R. Blattner (2005). "Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(16): 15921-15927.
- Liu, Y., Y. Li and X. Wang (2017). "Molecular evolution of acetohydroxyacid synthase in bacteria." Microbiologyopen **6**(6).
- Loiseau, L., S. Ollagnier-de Choudens, D. Lascoux, E. Forest, M. Fontecave and F. Barras (2005). "Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(29): 26760-26769.
- Lopes, J. M. and R. P. Lawther (1989). "Physical identification of an internal promoter, *ilvAp*, in the distal portion of the *ilvGMEDA* operon." Gene **76**(2): 255-269.
- Luli, G. W. and W. R. Strohl (1990). "Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations." Appl Environ Microbiol **56**(4): 1004-1011.
- Macomber, L. and J. A. Imlay (2009). "The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8344-8349.

- Magnusson, L. U., A. Farewell and T. Nystrom (2005). "ppGpp: a global regulator in Escherichia coli." Trends Microbiol **13**(5): 236-242.
- Mahadevan, R., J. S. Edwards and F. J. Doyle, 3rd (2002). "Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in Escherichia coli." Biophys J **83**(3): 1331-1340.
- Marahiel, M. A. (2016). "A structural model for multimodular NRPS assembly lines." Nat Prod Rep **33**(2): 136-140.
- Miethke, M. and M. A. Marahiel (2007). "Siderophore-based iron acquisition and pathogen control." Microbiol Mol Biol Rev **71**(3): 413-451.
- Miller, M. J. (2002). "Syntheses and therapeutic potential of hydroxamic acid based siderophores and analogs." Chemical Reviews **89**(7): 1563-1579.
- Miller, R. D. and D. L. Hartl (1986). "Biotyping Confirms a Nearly Clonal Population Structure in Escherichia Coli." Evolution **40**(1): 1-12.
- Nachin, L., L. Loiseau, D. Expert and F. Barras (2003). "SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress." EMBO J **22**(3): 427-437.
- Nazir, A. and R. Harinarayanan (2016). "(p)ppGpp and the bacterial cell cycle." J Biosci **41**(2): 277-282.
- Neuberg, C. and J. Hirsch (1921). "An enzyme which brings about union into carbon chains (Carboligase)." Biochemische Zeitschrift **115**: 282-310.
- Notebaart, R. A., B. Kintsjes, A. M. Feist and B. Papp (2018). "Underground metabolism: network-level perspective and biotechnological potential." Curr Opin Biotechnol **49**: 108-114.
- O'Brien, P. J. and D. Herschlag (1999). "Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities." Chem Biol **6**(4): R91-R105.
- Ochman, H. and R. K. Selander (1984). "Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations." J Bacteriol **157**(2): 690-693.
- Oh, M. K., L. Rohlin, K. C. Kao and J. C. Liao (2002). "Global expression profiling of acetate-grown Escherichia coli." J Biol Chem **277**(15): 13175-13183.
- Orskov, F. and I. Orskov (1961). "The fertility of Escherichia coli antigen test strains in crosses with K 12." Acta Pathol Microbiol Scand **51**: 280-290.
- Outten, F. W., O. Djaman and G. Storz (2004). "A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in Escherichia coli." Mol Microbiol **52**(3): 861-872.
- Pao, S. S., I. T. Paulsen and M. H. Saier, Jr. (1998). "Major facilitator superfamily." Microbiol Mol Biol Rev **62**(1): 1-34.
- Pfeifer, B. A., C. C. Wang, C. T. Walsh and C. Khosla (2003). "Biosynthesis of Yersiniabactin, a complex polyketide-nonribosomal peptide, using Escherichia coli as a heterologous host." Appl Environ Microbiol **69**(11): 6698-6702.
- Porcheron, G., A. Garenaux, J. Proulx, M. Sabri and C. M. Dozois (2013). "Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence." Front Cell Infect Microbiol **3**: 90.
- Posey, J. E. and F. C. Gherardini (2000). "Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen." Science **288**(5471): 1651-1653.
- Potrykus, K. and M. Cashel (2008). "(p)ppGpp: still magical?" Annu Rev Microbiol **62**(1): 35-51.
- Pramanik, J. and J. D. Keasling (1998). "Effect of Escherichia coli biomass composition on central metabolic fluxes predicted by a stoichiometric model." Biotechnol Bioeng **60**(2): 230-238.

- Pue, N. and L. W. Guddat (2014). "Acetohydroxyacid synthase: a target for antimicrobial drug discovery." Curr Pharm Des **20**(5): 740-753.
- Reimers, J. M., K. H. Schmidt, A. Longacre, D. K. Reschke and B. E. Wright (2004). "Increased transcription rates correlate with increased reversion rates in leuB and argH Escherichia coli auxotrophs." Microbiology (Reading) **150**(Pt 5): 1457-1466.
- Ren, B., N. Zhang, J. Yang and H. Ding (2008). "Nitric oxide-induced bacteriostasis and modification of iron-sulphur proteins in Escherichia coli." Mol Microbiol **70**(4): 953-964.
- Rhee, K. Y., B. S. Parekh and G. W. Hatfield (1996). "Leucine-responsive regulatory protein-DNA interactions in the leader region of the ilvGMEDA operon of Escherichia coli." J Biol Chem **271**(43): 26499-26507.
- Romano, A. H. and T. Conway (1996). "Evolution of carbohydrate metabolic pathways." Res Microbiol **147**(6-7): 448-455.
- Schubert, S., B. Picard, S. Gouriou, J. Heesemann and E. Denamur (2002). "Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in Escherichia coli causing extraintestinal infections." Infect Immun **70**(9): 5335-5337.
- Smith, H. W. (1975). "Survival of orally administered E. coli K 12 in alimentary tract of man." Nature **255**(5508): 500-502.
- Sorsa, L. J., S. Dufke, J. Heesemann and S. Schubert (2003). "Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic Escherichia coli: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor." Infect Immun **71**(6): 3285-3293.
- Srivatsan, A. and J. D. Wang (2008). "Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp." Curr Opin Microbiol **11**(2): 100-105.
- Stetter, J., H. M. Brown, J. C. Cotterman, M. W. Drewes, G. J. DeBoer, S. K. Gee, B. C. Gerwick, J. V. Hay, W. A. Kleschick and D. W. Ladner (2012). Herbicides Inhibiting Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Recent Developments, Springer Berlin Heidelberg.
- Stieglitz, B. I. and J. M. Calvo (1974). "Distribution of the isopropylmalate pathway to leucine among diverse bacteria." J Bacteriol **118**(3): 935-941.
- Tan, G., J. Lu, J. P. Bitoun, H. Huang and H. Ding (2009). "IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in Escherichia coli under aerobic growth conditions." Biochem J **420**(3): 463-472.
- Tanford, C. (2002). "Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins." Journal of the American Chemical Society **84**(22): 4240-4247.
- Tani, T. H., A. Khodursky, R. M. Blumenthal, P. O. Brown and R. G. Matthews (2002). "Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(21): 13471-13476.
- Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard and E. Denamur (2010). "The population genetics of commensal Escherichia coli." Nat Rev Microbiol **8**(3): 207-217.
- Tyagi, R., Y. T. Lee, L. W. Guddat and R. G. Duggleby (2005). "Probing the mechanism of the bifunctional enzyme ketol-acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis of the active site." FEBS J **272**(2): 593-602.
- Umbarger, H. E. (1956). "Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine." Science **123**(3202): 848.

Umbarger, H. E. and B. Brown (1956). "Threonine deamination in *Escherichia coli*. I. D- and L-threonine deaminase activities of cell-free extracts." J Bacteriol **71**(4): 443-449.

Umbarger, H. E. and B. Brown (1957). "Threonine deamination in *Escherichia coli*. II. Evidence for two L-threonine deaminases." J Bacteriol **73**(1): 105-112.

Umbarger, H. E. and B. Brown (1958). "Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VII. A negative feedback mechanism controlling isoleucine biosynthesis." J Biol Chem **233**(2): 415-420.

Valdebenito, M., A. L. Crumbliss, G. Winkelmann and K. Hantke (2006). "Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917." Int J Med Microbiol **296**(8): 513-520.

Vinella, D., C. Albrecht, M. Cashel and R. D'Ari (2005). "Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **56**(4): 958-970.

Vinogradov, V., M. Vyazmensky, S. Engel, I. Belenky, A. Kaplun, O. Kryukov, Z. Barak and D. M. Chipman (2006). "Acetohydroxyacid synthase isozyme I from *Escherichia coli* has unique catalytic and regulatory properties." Biochim Biophys Acta **1760**(3): 356-363.

Vyazmensky, M., Y. Zherdev, A. Slutzker, I. Belenky, O. Kryukov, Z. Barak and D. M. Chipman (2009). "Interactions between large and small subunits of different acetohydroxyacid synthase isozymes of *Escherichia coli*." Biochemistry **48**(36): 8731-8737.

Wallon, G., K. Yamamoto, H. Kirino, A. Yamagishi, S. T. Lovett, G. A. Petsko and T. Oshima (1997). "Purification, catalytic properties and thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1337**(1): 105-112.

Walsh, K. and D. E. Koshland, Jr. (1984). "Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles. The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt." J Biol Chem **259**(15): 9646-9654.

Watts, R. E., M. Totsika, V. L. Challinor, A. N. Mabbett, G. C. Ulett, J. J. De Voss and M. A. Schembri (2012). "Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli*." Infect Immun **80**(1): 333-344.

Whittam, T. S., H. Ochman and R. K. Selander (1983). "Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(6): 1751-1755.

Wolfe, A. J. (2005). "The acetate switch." Microbiol Mol Biol Rev **69**(1): 12-50.

Womack, J. E. and G. A. O'Donovan (1978). "Orotic acid excretion in some wild-type strains of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **136**(2): 825-827.

2. Développement méthodologique

Au cours des 20 dernières années les approches omiques telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique, ou la métabolomique ont été développées afin de mieux comprendre le fonctionnement cellulaire et les mécanismes associés. Parmi ces approches, la métabolomique vise à identifier et/ou quantifier les métabolites, et la fluxomique vise à identifier la topologie des réseaux métaboliques et à quantifier les flux portés par ces réactions. Ces approches bénéficient largement de stratégies de marquage isotopique, dont le principe consiste en l'incorporation d'une source de nutriment(s) enrichi(s) en isotopes (^2H , ^{13}C , ^{15}N , etc...). La mesure quantitative de l'incorporation des isotopes dans les différents métabolites est ainsi exploitée pour identifier les métabolites (Giavalisco *et al.* 2009), caractériser les voies métaboliques (Szyperski 1998), quantifier des métabolites par des stratégies de type IDMS (Isotope Dilution Mass Spectrometry (Garcia Alonso and Rodriguez-González 2013), et quantifier les flux métaboliques *in vivo* (Berges *et al.* 2021).

La mesure quantitative du contenu isotopique des métabolites nécessite des outils analytiques puissants, sensibles et robustes. Deux principales techniques complémentaires sont utilisées dans ce but : la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire (Zamboni *et al.* 2009). Les informations isotopiques obtenues par chacune de ces techniques sont brièvement décrites dans la suite de ce chapitre, et les développements réalisés dans le cadre de ce travail de thèse afin d'évaluer et d'augmenter la capacité de mesure isotopique par RMN sont présentés. Ces travaux ont fait l'objet de deux publications.

2.1. Méthodes d'analyse du marquage isotopique

Dans le cadre d'expériences de marquage isotopique au ^{13}C , un métabolite contenant n atomes de carbone peut donner lieu à 2^n formes isotopiques (**Figure 14**). Sur le plan analytique, l'enjeu consiste à quantifier la proportion des différentes formes isotopiques. A ce jour, aucune technique ne permet de quantifier l'ensemble des formes

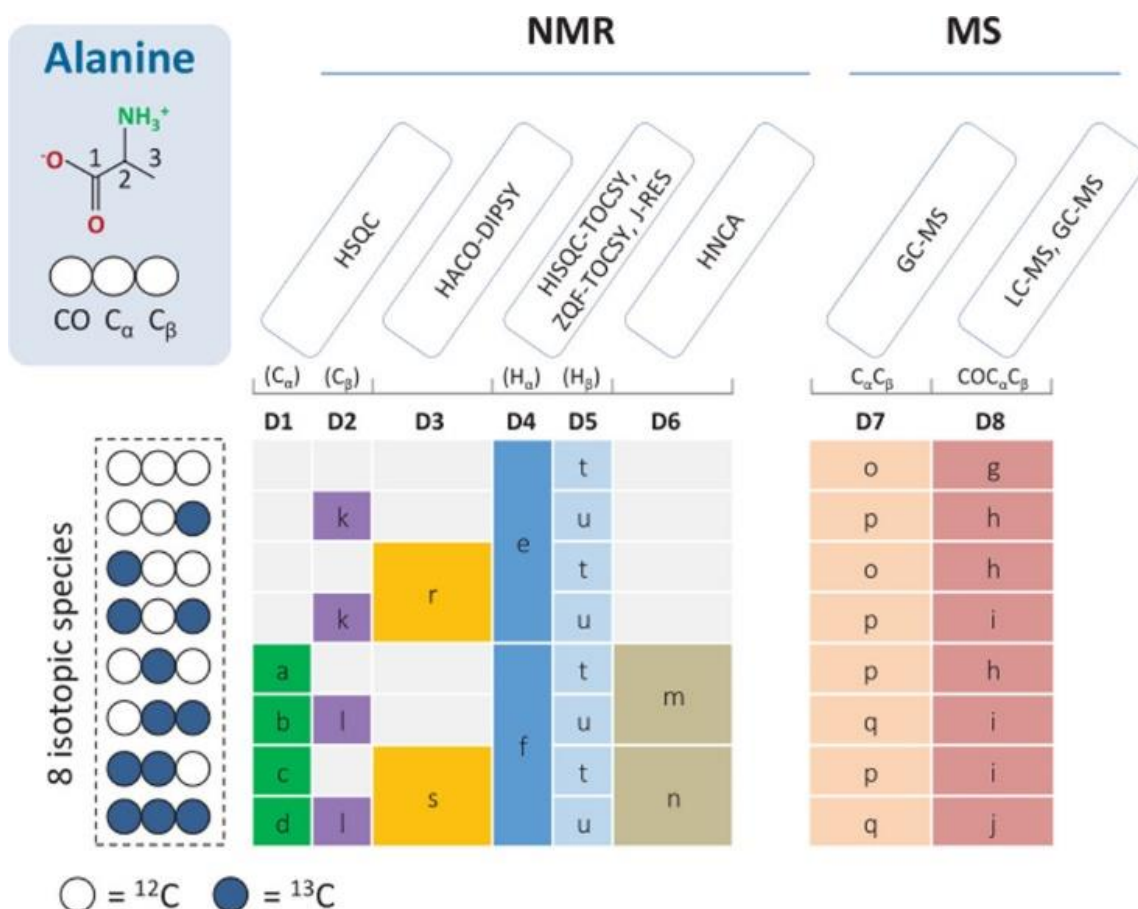


Figure 14 : Méthodes d'analyse des isotopes de l'alanine par RMN et MS. Les 8 formes isotopiques de l'alanine sont présentées à gauche avec carbones non marqué ^{12}C en blanc et les carbones marqués ^{13}C en bleu. Pour chaque ensemble de données (D1-D8), chaque groupe de mesures est représenté par une couleur spécifique, et les lettres font référence aux (ensembles d') espèces qui sont quantifiées par rapport à la quantité de toutes les espèces présentes dans le groupe correspondant. (Extrait de (Millard et al. 2021))

isotopiques d'un métabolite.

La spectrométrie de masse permet de séparer les molécules en fonction de leur masse, et ainsi de distinguer les différents isotopologues d'un composé, i.e. les espèces

ayant intégré un nombre différent d'isotopes (**Figure 14**), sans toutefois pouvoir obtenir d'information sur positionnelle sur l'incorporation d'isotopes. Cette technique est hautement sensible et permet l'analyse de classes de métabolites variées. Son couplage avec des méthodes séparatives telles que la chromatographies gazeuses (GC/MS) ou liquide (LC/MS) permet d'améliorer la spécificité et la sélectivité de l'analyse, et a ainsi ouvert la voie à l'analyse de mélanges complexes (milieux de culture, extraits cellulaires, hydrolysats de biomasse, etc...). De par la diversité physico-chimique des métabolites, l'analyse par MS nécessite de développer des méthodes de préparation des échantillons, de séparation et d'ionisation adaptées pour chacune des classes de composés d'intérêts. De plus la MS dégrade les échantillons analysés, ce qui ne permet pas leur réutilisation pour d'autres analyses ultérieures.

La RMN est une technique hautement complémentaire à la MS. Cette technique bénéficie d'une moindre sensibilité et d'un coût significativement plus élevé mais permet cependant d'obtenir des informations positionnelles au travers de l'exploitation des couplages proton-carbone et carbone-carbone. Cette technique est non dégradative et permet l'analyse directe d'échantillons complexes ou non, sans passer par des étapes séparatives. La RMN permet ainsi un accès direct aux différentes positions isotopiques des molécules (**Figure 14**).

Deux grands types d'informations sont obtenues lors de l'acquisition de spectres RMN : i) l'enrichissement spécifique par des approches de RMN ^1H , qui correspond à la proportion d'incorporation d'isotopes ^{13}C à une position donnée du squelette carboné d'un métabolite, et ii) les isotopomères de position par des approches de RMN ^{13}C (**Figure 14**), qui correspond à la proportion d'isotopes ^{13}C incorporés dans les positions voisines d'un carbone ^{13}C . Ces informations sont accessibles dans des milieux peu complexes, mais le nombre de signaux présents sur les spectres augmente pour les échantillons

complexes, entraînant des chevauchements de pics. Cette complexification rend difficile, voire impossible, l'analyse des différents signaux. Pour pallier à ce problème, des méthodes d'analyse en deux dimensions ont été développées à la fin des années 90 (Szyperski 1995, Szyperski 1998). L'augmentation significative du temps d'acquisition nécessaire pour l'obtention de spectres RMN 2D à une résolution suffisante pour quantifier les différentes espèces isotopiques rend toutefois les expériences longues (plusieurs heures), ce qui limite le débit d'analyse.

2.2. Evaluation de la séquence PSYCHE dans le cadre d'analyses isotopiques

Durant ma thèse, une partie de mon travail a été de mettre en place, en collaboration avec Guy Lippens et Davy Sinnaeve, une méthode RMN permettant d'obtenir des données quantitatives plus fines lors d'expériences de marquage isotopique. Les méthodes actuelles, telles que l'HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**orrelation) ou l'HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation), permettent, grâce à une observation dans les dimensions ^1H et ^{13}C , d'obtenir en partie ces informations. Toutefois, pour obtenir des résolutions suffisantes, il est nécessaire d'acquérir une grande quantité de points et, par conséquent, d'allonger la durée d'analyse (de 2h à $\pm 10\text{h}$) et de potentiellement coupler le résultat à d'autres méthodes comme l'HMBC pour détecter les couplages à plus longue distance. L'observation directe des signaux proton, *via* des acquisitions 1D ^1H , contient en principe les mêmes informations de couplages que des acquisitions 2D ^1H - ^{13}C . Toutefois, les constantes de couplage hétéronucléaire en ^2J et ^3J sont comparables aux constantes

de couplage ^1H - ^1H homonucléaire. Cette confusion rend difficile la détermination des différents isotopomères (Lloyd *et al.* 2004).

Ces dernières années, des séquences telles que la Pure Shift (Zangger 2015) ont été développées pour simplifier les spectres ^1H en supprimant les couplages homonucléaires. De cette manière, seuls les couplages hétéronucléaires ^1H - ^{13}C sont conservés, diminuant le nombre de signaux et simplifiant les spectres, tout en conservant

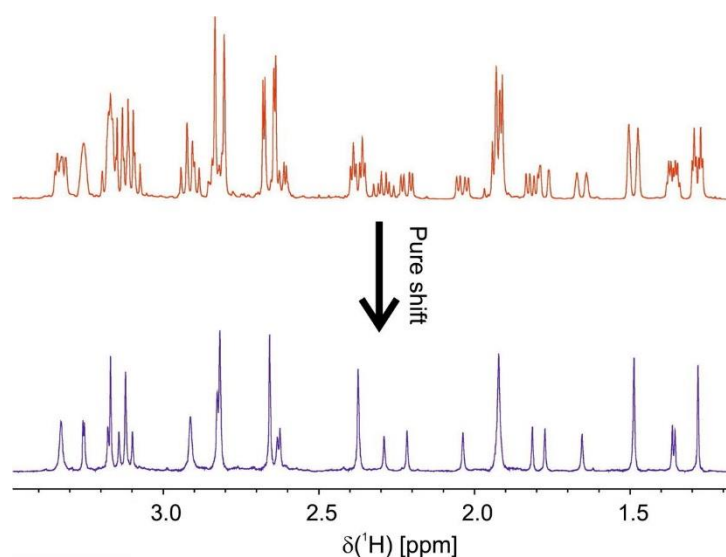


Figure 15: Comparaison entre une acquisition ^1H avec couplage homonucléaire et une acquisition Pure Shift (Zangger 2015).

l'ensemble des informations isotopiques d'intérêt (**Figure 15**). Cette méthode souffre toutefois d'une diminution significative de la sensibilité en comparaison d'une acquisition ^1H classique, limitant son application.

Pour y remédier nous avons choisi de nous baser sur une approche heteronuclear 2D J-resolved. Cette séquence a la propriété de conserver les déplacements chimiques dans la dimension directe, tout en permettant basculant la multiplicité liée aux couplages homonucléaires et hétéronucléaires dans la dimension indirecte. Cette méthode d'acquisition est donc une source importante d'informations aussi bien sur la nature du métabolite que sur son marquage lors d'expériences de marquage isotopique. Les

couplages homonucléaires et hétéronucléaires évoluant de la même façon dans cette approche, les résultats souffrent malheureusement d'une mauvaise résolution qui peut être contournée grâce à l'application d'un filtre adiabatique sur l'axe z (Cahoreau *et al.* 2012).

Les spectres obtenus par des approches heteronuclear 2D J-resolved restent complexes à interpréter, en particulier en présence de marquage ^{13}C qui multiplie le nombre de signaux. Pour faciliter l'interprétation et visualiser spécifiquement les coupages ^1H - ^{13}C , comme sur des acquisitions Pure shift, la méthode de Pell et Keeler (Pell and Keeler 2007) a été appliquée avec l'addition d'une séquence PSYCHE (**P**ure **S**hift **Y**ielded by **C**harp **E**xcitation) (Foroozandeh *et al.* 2014). Le résultat de cette nouvelle séquence est l'obtention d'un spectre 2D avec, pour chaque proton, le couplage ^1H - ^{13}C en diagonale.

Afin d'évaluer cette nouvelle approche, nous nous sommes appuyés sur la voie des BCAA dont la topologie est bien caractérisée. La Pure Shift Heteronuclear 2D J-Resolved a permis une analyse extrêmement fine du marquage de la valine, de l'isoleucine et de la leucine (Sinnaeve *et al.* 2018), en accord avec les mécanismes de biosynthèse de ces acides aminés (Adelberg 2002, Strassman *et al.* 2002).

2.3. Approches alternatives pour augmenter les débits d'analyses isotopiques

Une des principales limitations de ces dernières années est le débit d'analyse, dont les besoins ont explosés avec le développement de systèmes de culture automatisés (Heux *et al.* 2014). Il est nécessaire, par conséquent, d'optimiser les techniques d'analyses pour réduire significativement le temps d'analyse sans compromettre la résolution. Dans le sous chapitre précédent, une approche de Pure shift het-2DJ a été développée. Cette méthode, bien qu'extrêmement informative, nécessite des acquisitions d'une quinzaine

d'heures. Dans un contexte d'analyse à haut débit, il n'est donc pas possible d'envisager ce type d'acquisition. Pour répondre aux besoins actuels en terme de débit, nous avons évalué deux stratégies complémentaires :

- l'augmentation du champ magnétique, qui permet de gagner en sensibilité (et donc en temps d'analyse) ainsi qu'en résolution
- l'utilisation du deutérium, qui permet de simplifier les signaux obtenus en supprimant les couplages proton-proton, et ainsi de s'affranchir de la nécessité de séquences longues de type PSYCHE.

Les résultats, là encore analysés en s'appuyant sur la voie des BCAA, sont présentés dans la publication (Dinclaux *et al.* 2020).

2.4. Improved Isotopic Profiling by Pure Shift Heteronuclear 2D J-Resolved NMR Spectroscopy

Davy Sinnaeve¹, Mickael Dinclaux², Edern Cahoreau², Pierre Millard², Jean-Charles Portais², Fabien Létisse², and Guy Lippens²

¹ NMR and Structure Analysis Unit, Department of Organic and Macromolecular Chemistry, Ghent University, Ghent, B-9000, Belgium

² LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, 31077, France

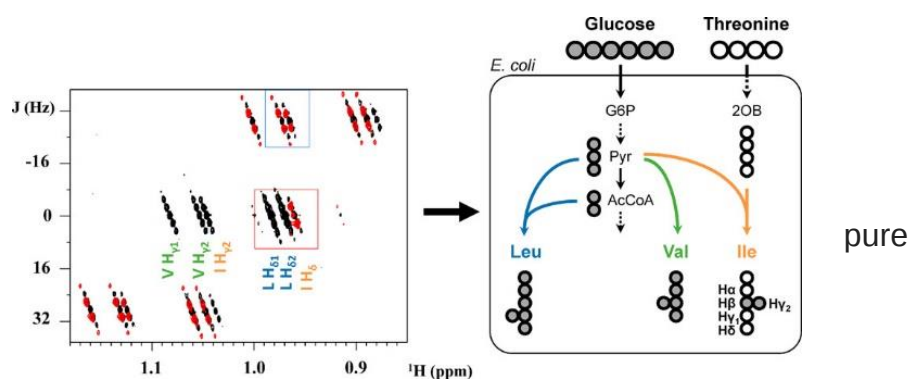
Analytical Chemistry, 2018, 90, 4025–4031 / DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05206

Abstract

Quantitative information on the carbon isotope content of metabolites is essential for flux analysis. Whereas this information is in principle present in proton NMR spectra through both direct and long-range heteronuclear coupling constants, spectral overlap and homonuclear coupling

constants both hinder its extraction.

We demonstrate here how shift 2D J-resolved NMR spectroscopy can



simultaneously remove the homonuclear couplings and separate the chemical shift information from the heteronuclear coupling patterns. We demonstrate the power of this method on cell lysates from different bacterial cultures and investigate in detail the branched chain amino acid biosynthesis.

Introduction

Measurement of the carbon isotopic content of different metabolites is a powerful tool to quantify fluxes in living systems (Fan and Lane 2008, Lane and Fan 2017, Lane and Fan 2007, Massou *et al.* 2007, Mueller and Heinzle 2013, Ruiz *et al.* 2015). Spanning the different forms of life, the approach has found applications in the study of bacteria, (Szyperski 1995, Szyperski 1998, Szyperski *et al.* 1999, Wittmann 2002) yeast (Hackett *et al.* 2016, Maaheimo *et al.* 2001) plants, (Ratcliffe and Shachar-Hill 2005) and humans. (Hensley *et al.* 2016) In the latter case, the altered metabolism of cancer cells has attracted significant interest. (DeBerardinis and Chandel 2016, Ducker and Rabinowitz 2017, Tavares *et al.* 2015) Two main techniques used for such analysis are mass spectroscopy (Ruiz *et al.* 2015, Wittmann 2002) and NMR, (Fan and Lane 2016, Szyperski 1998) and recent trends integrate both methods. (Chong *et al.* 2017) Whereas the former has the main advantage of tremendous sensitivity, allowing the determination of isotope distribution of ever smaller samples, determination of the exact position of the ^{13}C nucleus in a given metabolite remains challenging. NMR spectroscopy on the other hand suffers from low sensitivity but has, at least in principle, the possibility to determine the ^{13}C content at the individual positions of a metabolite. However, in practice, this is often complicated by overlap within the ^1H NMR spectrum, especially when the sample is a complex mixture of metabolites. The limited chemical shift dispersion combined with the many line-splittings due to ^1H – ^1H and ^1H – ^{13}C couplings thereby hinder accurate integration of individual signals.

A second challenge that exists for both techniques is the detailed determination of isotopomer distributions, i.e., not just giving the ^{13}C content of a given carbon but quantifying the populations of all different isotopomers of the molecule. (van Winden *et al.*

2002) ^{13}C – ^{13}C couplings can be exploited for this purpose, but they give only information on the neighbors of ^{13}C carbons. (Fan and Lane 2016) Moreover, observed in the indirect dimension of a ^1H – ^{13}C HSQC experiment, the requirement for a large number of points to cover the full ^{13}C chemical shift window with a resolution that allows one to distinguish these ^{13}C homonuclear couplings leads to lengthy experiments. At higher magnetic fields, this requirement becomes even more stringent. For the determination of the isotopomer distribution of the CO – C_α – C_β three carbon block of amino acids, we recently showed that starting from the ^{15}N amine moiety has distinct advantages in terms of acquisition speed and completeness of information. (Millard *et al.* 2017) Nevertheless, when one wants to focus on ^{13}C incorporation further in the side chains of the amino acids or in other metabolites lacking nitrogen, the ^{15}N based approach has its limits.

Direct observation of the proton signals can give, at least in principle, the same information through their long-range ^1H – ^{13}C couplings to distant carbons, but one confounding factor for such an analysis is that these long-range (2J or 3J) ^1H – ^{13}C heteronuclear coupling constants are comparable in magnitude to the homonuclear proton–proton couplings and thereby make rather complex the pattern recognition to quantify isotopomers. (Lloyd *et al.* 2004) Recently, a number of approaches have been proposed to remove homonuclear splittings in proton NMR spectra. Collectively known as pure shift methods, they can be broadly grouped as real-time homonuclear decoupling methods or as indirect methods obtaining the same goal through a pseudo-nD (interferogram) spectrum. (Castanar and Parella 2015, Meyer and Zangger 2014, Zangger 2015) Although pure shift methods generally suffer from a loss of sensitivity relative to a parent NMR experiment (Castanar and Parella 2015) (band-selective methods (Adams *et al.* 2014, Castanar *et al.* 2013, Ying *et al.* 2014) and the BIRD homodecoupling in the acquisition of a ^1H – ^{13}C HSQC spectrum on a sample at natural abundance (Paudel *et al.*

2013) being the exception), the resulting spectral simplification largely compensates for this.

We introduce here the pure shift method in the heteronuclear 2D *J*-resolved (het-2DJ) pulse sequence that was previously proposed for ^{13}C fluxomics. (Cahoreau *et al.* 2012, Ludwig and Viant 2010) We first illustrate the method on the differently labeled forms of alanine and subsequently evaluate its performance on a real cell extract from bacterial cultures grown under different conditions. A Pascal triangle (PT) sample, which contains metabolites with equal amounts of each isotopomer, (Millard *et al.* 2014) validates the quantitative nature of the method. The measurement of ^{13}C incorporation in the aliphatic side chains of the branched chain amino acids (BCAA) Ile, Leu and Val, obtained from a bacterial culture grown on $\text{U-}^{13}\text{C}$ labeled glucose with unlabeled Thr underscores the superior resolution of the pure shift het-2DJ experiment and allows quantitative elucidation of the biosynthetic pathway of the BCAA in the absence of protein overexpression, thereby providing novel biochemical insight.

Results and Discussion

- **Omitting the ^{13}C Decoupling Improves Resolution**

2D J -resolved spectroscopy aims to separate chemical shift and coupling information along two separate dimensions, reducing spectral overlap between multiplets along the chemical shift (horizontal) dimension and allowing multiplet pattern analysis for each proton in the (vertical) J -dimension. For the originally proposed 2D J -resolved pulse sequence for heteronuclear couplings (het-2DJ), (Bodenhausen *et al.* 1976, Freeman and Hill 1971) a fundamental issue is that ^1H – ^1H couplings evolve simultaneously with ^1H – ^{13}C couplings. Not only does this interfere with heteronuclear coupling analysis, with multiplets where homo- and heteronuclear couplings are mixed, but also it leads to peaks possessing a phase twisted line shape. The dispersive component in this line shape has a highly unfavorable impact on both resolution and coupling measurement accuracy. The current state-of-the-art het-2DJ sequence for ^{13}C fluxomics (Cahoreau *et al.* 2012, Ludwig and Viant 2010) solves this issue by applying an adiabatic z-filter after the t_1 -evolution period (**Figure 16**) (Luy 2009, Thrippleton and Keeler 2003). This purges the ^1H antiphase terms before the acquisition and thereby provides pure absorption mode lineshapes. ^{13}C decoupling during acquisition further removes the ^1H – ^{13}C splittings from the chemical shift dimension. As a result, the ^1H – ^{13}C couplings only show up in the J -dimension, and signals from isotopomers where the proton is bound to a ^{12}C carbon (found on the horizontal $J = 0$ Hz line) are separated from ^{13}C -bound ones (found at $J = \pm^1J_{\text{CH}}/2$). This is illustrated for the alanine methyl signal in a 50:50 mixture of unlabeled and uniformly ^{13}C labeled Ala (**Figure 16**, bottom left). Integration of the signals at $J = 0$ Hz (unlabeled Ala) and at $J = \pm^1J_{\text{CH}}/2$ (labeled Ala) provides the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ratio of the methyl group (Cahoreau *et al.* 2012).

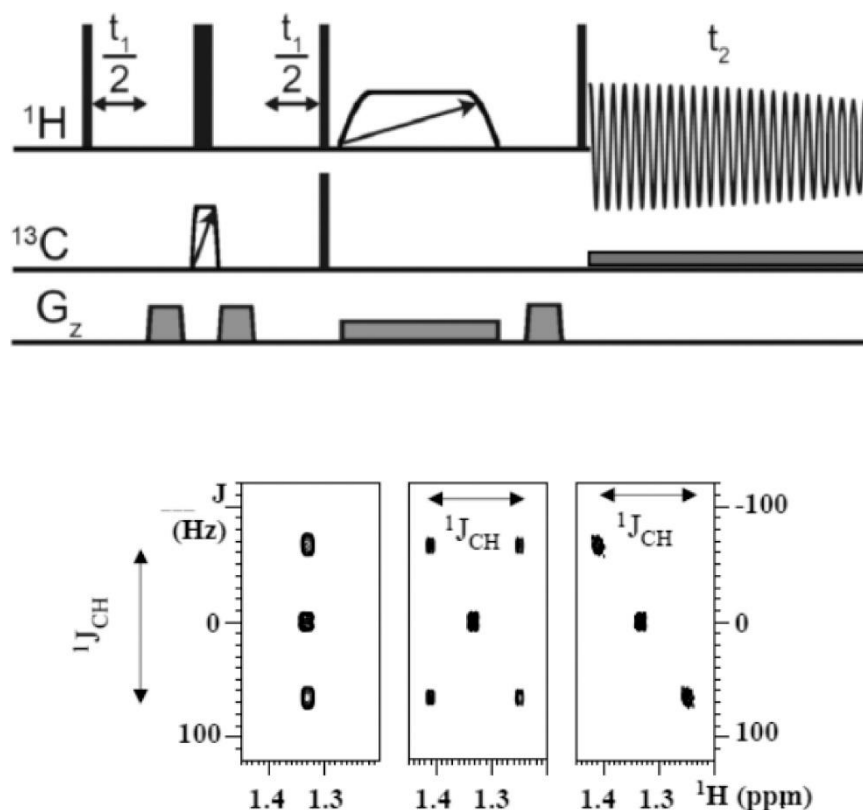


Figure 16 : (top) Pulse sequence of the het-2DJ experiment with an adiabatic z-filter after the t_1 evolution (Cahoreau et al. 2012, Ludwig and Viant 2010). (bottom) The methyl signals of a 50:50 mix of U- ^{13}C and U- ^{12}C Ala in the het-2DJ experiment, with (left) or without (middle) ^{13}C decoupling during the acquisition. Omitting the ^{13}C $\pi/2$ pulse after the t_1 evolution in the absence of ^{13}C decoupling simplifies the square of the ^{13}C bound protons to a diagonal (right).

Unfortunately, the spectral resolution of this experiment is severely limited as ^{13}C decoupling restricts the acquisition time and thus resolution in the direct dimension. Switching of the decoupling leads to sharper resonances but at the expense of doubling the number of peaks for the ^{13}C bound protons in the chemical shift dimension (**Figure 16**, bottom middle). Removal of the $\pi/2$ ^{13}C purge pulse after the t_1 evolution and before the adiabatic z-filter cancels this line doubling by projecting the ^1H - ^{13}C coupling along a -45° axis (**Figure 16**, bottom right) (see [Supporting Information and Figure S1](#) for a technical explanation). With minimal changes to the het-2DJ pulse sequence, we can thus obtain improved resolution without increasing spectral complexity.

- **Separating Coupling and Chemical Shift Information**

A second issue is that the adiabatic z-filter element does generate square patterns in the 2D spectrum (**Figure 17**, left), though now in terms of ^1H – ^1H couplings (Luy 2009, Simova *et al.* 1997). The spectral resolution thus becomes limited by the ^1H – ^1H multiplet widths, which in the crowded spectra of complex physiological mixtures can be a significant drawback. Pell and Keeler (Pell and Keeler 2007) introduced an approach that not only delivers pure absorption mode lineshapes in homonuclear 2DJ spectra without requiring a z-filter but also disperses the ^1H – ^1H multiplets along the -45° angle rather than in a square. The Pell-Keeler method requires the acquisition of both a normal (N) and reversed (R) 2DJ spectrum with inverted senses of t_1 evolution, which is achieved by sampling t_1 either before or after a so-called active spin refocusing element such as a Zangger-Sterk (Zangger and Sterk 1997) or PSYCHE (Foroozandeh *et al.* 2015, Foroozandeh *et al.* 2014) element. Here, we apply the PSYCHE element, because it generally sacrifices less sensitivity (typically only 1 order of magnitude) than Zangger-Sterk and has good tolerance for strong coupling. When we add ^{13}C π pulses to the Pell-Keeler homonuclear 2DJ sequence ([Figure S2](#)), we obtain a het-2DJ spectrum with both ^1H – ^1H and ^1H – ^{13}C couplings dispersed along the -45° diagonal (**Figure 17**, middle; [Figure S3](#)).

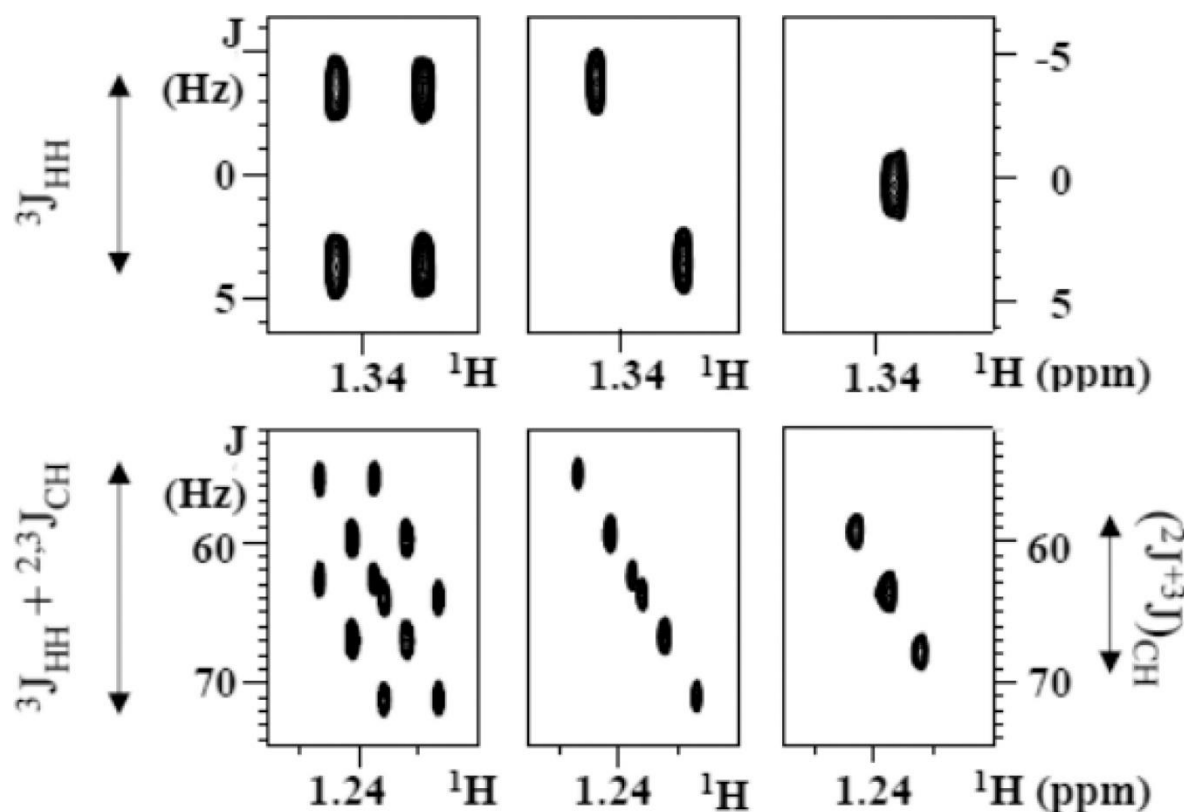


Figure 17 : Fine structure of the methyl signals of $U\text{-}^{12}\text{C}$ (top) and $U\text{-}^{13}\text{C}$ (bottom) Ala. $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ proton couplings show up as a square pattern in the het-2DJ experiment (left), as a diagonal in the Pell-Keeler het-2DJ experiment (middle), and are fully suppressed in the pure shift het-2DJ experiment (right). Both direct and long-range $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ couplings are maintained along the diagonal for all experiments.

Because homo- and heteronuclear coupling constants are now dispersed along the same -45° diagonal, chemical shift and coupling information have become fully separated, which resolves the issue of multiplet overlap in crowded spectra. However, the improved resolution comes at a sensitivity penalty. Indeed, akin to any experiment using the PSYCHE element, only a subset of spins is selectively inverted, leading to a reduced signal-to-noise ratio (SNR) of about 1 order of magnitude (Foroozandeh *et al.* 2014). With a flip angle of 15° for the PSYCHE pulse, we determined that SNR for the Ala methyl signals decreased by a factor of 14 ± 2 whereas we found a reduction of 11 ± 1 for the Ha proton. A second minor drawback appeared when we evaluated the quantification of the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ratio in a mixed sample of unlabeled and ^{13}C -methyl labeled alanine. Whereas the het-2DJ experiment yielded the same value for the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ratio as that obtained with

a 1D proton spectrum, the Pell-Keeler sequence slightly underestimated the ^{13}C content by 2% percent. This is most likely due to differential relaxation losses taking place during the 30ms PSYCHE element, as magnetization of ^{13}C bound protons can relax more efficiently than that of its ^{12}C bound counterparts (Millard *et al.* 2017).

Nevertheless, when comparing both experiments, the improved resolution makes up for the loss in SNR. We demonstrate this on a PT sample, which is a complex mixture of metabolites (and notably amino acids) with all possible ^{13}C isotopomers present in equal amounts (Millard *et al.* 2014). The Pell-Keeler het-2DJ on this sample is shown in **Figure 18**. To illustrate the resolution gain, we show its projected 1D spectrum after tilting the spectrum by 45° . This aligns the multiplets vertically and places chemical shift information fully along the horizontal axis (unless a reduced window is used in the J-dimension, see [Figures S4 and S5](#) for the issue of folding). The projection onto the horizontal dimension indeed shows a greatly improved resolution compared to the 1D ^1H spectrum, whereby the signals of the methyls of the different branched chain amino acids (BCAA) Leu, Val, and Ile are now neatly separated. However, spectral tilting (in practice, the spectrum is sheared) distorts the 2D peak shapes, and for fluxomics analyses, it is usually preferred to omit the tilting step and retain the -45° 2D dispersion.

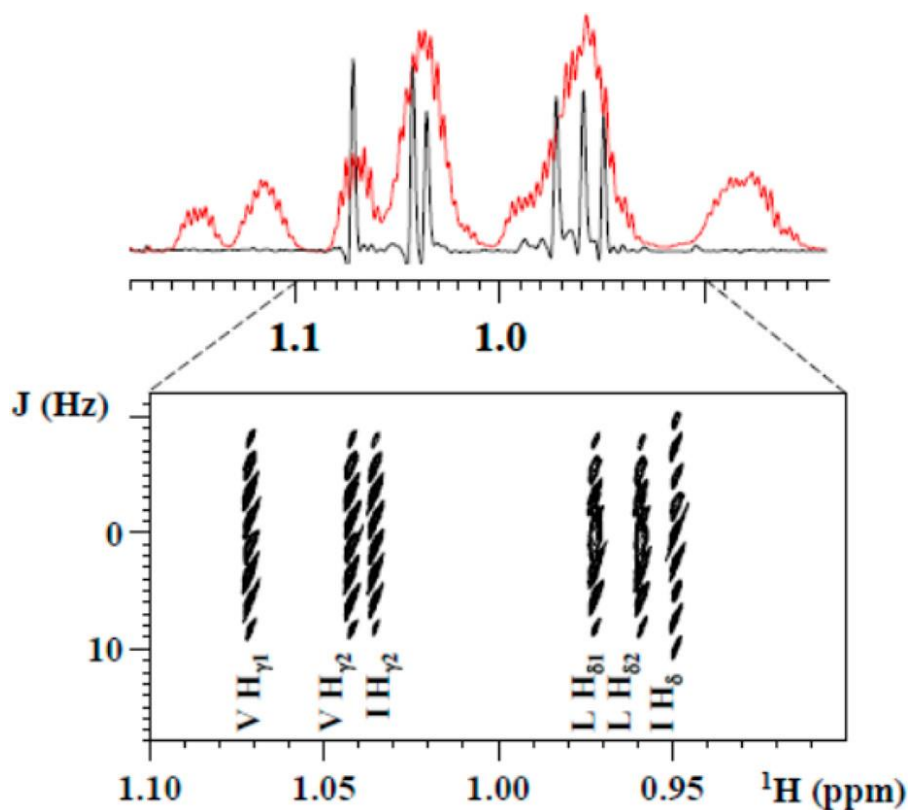


Figure 18 : Comparison of the 1D proton spectrum (top, red) of a PT labeled bacterial lysate and the projected 1D (top, black) of the tilted Pell-Keeler het-2DJ experiment (bottom) on the same sample. Only the ^{12}C linked methyl protons are shown.

For a carbon-bound proton, the multiplet pattern depends on (i) the isotope status (^{12}C or ^{13}C) of its directly bonded carbon, leading to a splitting of 120–150 Hz due to the $^1J_{\text{CH}}$ coupling in the case of a ^{13}C isotope, (ii) the isotope status of the carbon nuclei separated by two or three bonds from this proton, leading to smaller (2–10 Hz) splittings, and finally (iii) the homonuclear (^1H – ^1H) couplings. Each carbon-bound proton within a certain metabolite in the PT sample is thus represented in the spectrum by a very complicated superposition of multiplets. Since the one-bond $^1J_{\text{CH}}$ coupling is larger than the sum of all the multiple-bond couplings, isotopomers with ^{12}C or ^{13}C directly bound carbons give three well-separated groups of responses in the 2D spectrum, and integration of these three groups of signals directly gives the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ratio ([Figure S6](#)). We find an

average value of $45 \pm 2\%$ ^{13}C incorporation for the methyl signals of our PT sample, which should be compared to the expected value of 50%.

- **Removal of the ^1H – ^1H Proton Couplings in the het-2DJ Experiment**

Although the previous experiment separates the direct ^1H – ^{13}C coupling from chemical shift information, the fact that ^1H – ^1H and ^1H – ^{13}C long-range coupling information remains mixed in the indirect dimension hampers detailed analysis of these long-range ^1H – ^{13}C couplings. Full suppression of the ^1H – ^1H couplings can be achieved by introducing a pure shift interferogram acquisition scheme, resulting in a pseudo-3D experiment that arranges the indirect t_1 (J -evolution) and t_2 (pure chemical shift evolution) evolution times around the PSYCHE element and the ^1H and ^{13}C 180° pulses, in a similar way as recently done for homonuclear 2DJ experiments such as PSYCHEDELIC (Sinnaeve 2018, Sinnaeve *et al.* 2016). The resulting pure shift het-2DJ experiment (**Figure 19**) only maintains the heteronuclear coupling constants, as seen in **Figure 17** for the Ala mixture. The methyl group of the $\text{U-}^{12}\text{C}$ labeled Ala residue now shows up as a peak without splittings in any dimension, while the methyl protons in the $\text{U-}^{13}\text{C}$ labeled Ala residue, apart from the large $^1J_{\text{CH}}$ splitting, show further fine-structure due to their smaller long-range two- and three-bond couplings to the $^{13}\text{C}_\alpha$ and ^{13}CO carbon. Coupling patterns observed for separate Ala samples with exclusive $^{13}\text{C}_\alpha$ or ^{13}CO labeling ([Figure S3](#)) confirm that both individual 2J (to the $^{13}\text{C}_\alpha$) and 3J (to the ^{13}CO) couplings are comparable, thus giving rise to the triplet structure for the Ala H_β methyl protons as seen in **Figure 17**. The pure shift het-2DJ sequence thus maximizes heteronuclear coupling information by providing $^1J_{\text{CH}}$, $^2J_{\text{CH}}$, and $^3J_{\text{CH}}$ line splittings in the absence of homonuclear couplings, while minimizing complications of spectral overlap by providing this information orthogonally to the chemical shift.

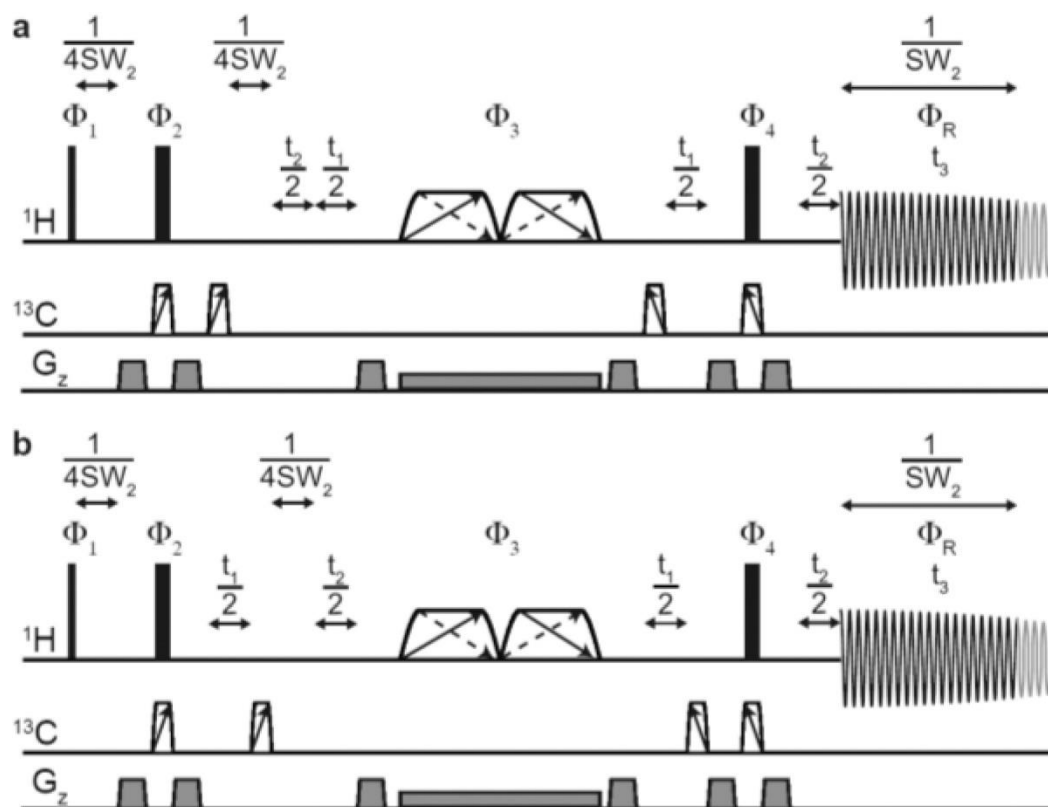


Figure 19 : Pulse sequence for the pure shift het-2DJ experiment. (a) N-type sequence; (b) R-type sequence. Trapezoidal pulses with double arrows are frequency-swept low flip-angle pulses (PSYCHE saltire). Trapezoidal ^{13}C pulses with single arrow are frequency-swept 180° pulses. Full details of the pulse sequence are given in [Figure S7](#).

As we can resolve long-range ^1H – ^{13}C coupling information on the -45° diagonal for a given proton, the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotope ratios of the carbon sites two or three bonds away from the proton on top of the isotope state of the directly bound carbon become accessible, and quantification of the contributions of these various ^1H – ^{13}C multiplets associated with cumulative isotopomers becomes within reach. Importantly, since only coupling constants are encoded in the pure shift het-2DJ sequence, the indirect dimension is limited to ca. 200 Hz, independently of the magnetic field, as opposed to the previously proposed ^1H – ^{13}C HSQC approach (Fan and Lane 2016). Because the pure shift het-2DJ experiment is run as a pseudo-3D sequence, it is useful to reduce the acquisition time by judiciously folding the spectrum in the indirect J -dimension ([Figure S4](#)). This was done here so that the ^{13}C labeled proton peaks fold in at $J = \pm 30$ Hz, leading to a 2-fold reduction in time

with peaks still sufficiently far from the $J = 0$ Hz axis to avoid overlap with the multiplets from the ^{12}C -bound protons (**Figure 20**).

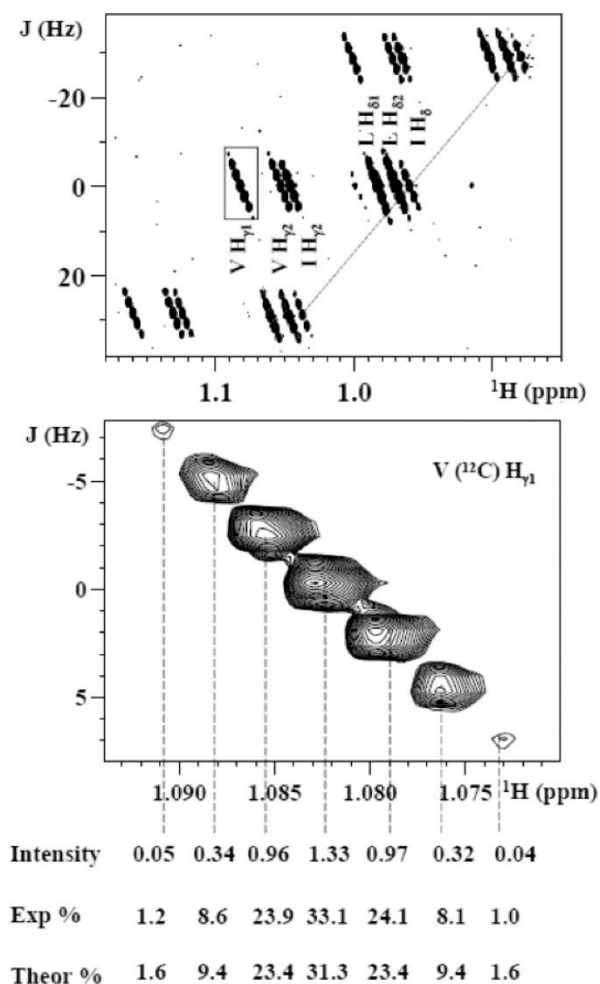


Figure 20 : Methyl region of the pure shift het-2DJ experiment on the lysate of a PT bacterial sample (top). The spectrum below is the expansion of the V (^{12}C)H γ_1 methyl resonance. This is a sum of ^1H - ^{13}C multiplets from individual isotopomers ([Figure S8](#)). The intensities of the different peaks correspond to the theoretical labeling expected for a PT sample.

To verify that the pure shift het-2DJ provides peak intensities that accurately reflect the presence of the various isotopomers, we evaluated the signal intensities of the different isotopomers in the experiment on the PT sample. Comparing the integral of the multiplets at $J = 0$ Hz or $J = \pm 30$ Hz for the BCAA methyl groups, we again find an average value of $46 \pm 4\%$ for the ^{13}C incorporation, slightly lower than the expected value of 50%. However, within a given multiplet, the isotope of the directly bound carbon is fixed (^{12}C or ^{13}C), and

we expect little influence on the relaxation rates for further away carbon atoms. For the Val ^{12}C $\text{H}_{\gamma 1}$ protons, for example, where the $^2J_{\text{CH}}$ coupling constant to the C_{β} carbon coexists with the $^3J_{\text{CH}}$ coupling to the $\text{C}_{\gamma 2}$ and C_{α} carbons, the intensity ratios for the different $^{12}\text{C}_{\gamma 1}-\text{C}_{\gamma 2}-\text{C}_{\beta}-\text{C}_{\alpha}$ isotopomers (**Figure 20**) indeed are in excellent agreement with the theoretical values expected for a PT sample ([Figure S8](#)). Importantly, we obtained identical values when running the 3D experiment with interscan delays of 3 or 1 s, which together with the folding of the J axis leads to an important reduction of experimental time.

Although the pure shift het-2DJ experiment, with the $^1\text{H}-^1\text{H}$ line splittings fully removed, disperses the signal into less 2D peak responses relative to the Pell-Keeler het-2DJ spectrum, its pseudo-3D interferogram acquisition results in significantly longer measurement times than the classical or Pell-Keeler het-2DJ experiments, which require only a true 2D acquisition scheme. On a typical bacterial lysate sample, the latter two experiments do not require more than 15 min. The full pure shift het-2DJ experiment run with the equivalent resolution in the F_2 dimension, even with folding of the J dimension and a 1 s interscan delay, takes 9 h. Further halving the number of acquired chunks can reduce this time to below 5 h while still retaining good resolution in the F_2 dimension. For a detailed analysis of the experimental times, we refer to the [Supporting Information](#). As for the applicability of the NMR experiments in fluxomics studies, a compromise between the number of conditions that can be investigated and the level of information (i.e., number and precision of fluxes) inferred from these experiments needs to be considered. The Pell-Keeler het-2DJ NMR experiment can be used to rapidly measure ^{13}C -enrichments at specific positions whereas the pure shift het-2DJ experiment gives access to detailed quantification of isotopomers. This ensures the applicability of the methods to cover the different ^{13}C -fluxomics approaches, which vary in terms of throughput and resolution,

including isotopic profiling, targeted ^{13}C -fluxomics, and global ^{13}C -fluxomics (Heux *et al.* 2017).

- **Isoleucine Biosynthesis in the Absence of Protein Overexpression**

The biosynthetic pathway of the branched chain amino acids (BCAA) Leu, Val, and Ile is well-known (Adelberg 2002, Strassman *et al.* 2002). Several of its involved enzymes constitute attractive antibiotic targets (Amorim Franco and Blanchard 2017), but these pathways have also been exploited in protein NMR to produce samples with selective ^{13}C labeling at the desired methyl position (Goto *et al.* 1999). The methodology has driven developments such as methyl-TROSY (Tugarinov *et al.* 2003, Tugarinov *et al.* 2004), thereby opening the NMR approach to ever larger complexes (Rosenzweig and Kay 2014, Wiesner and Sprangers 2015). Evaluation of the selected methyl incorporation has thereby mostly been done under conditions of protein overexpression, whereby the bacterial metabolism becomes massively geared toward the biosynthesis of the desired protein. However, recently, it was shown that the *Pichia pastoris* yeast cells consume a larger fraction of the 2-oxobutanoate (2OB) precursor when protein expression is induced (Zhang *et al.* 2017). It is thus interesting to test to what extent this precursor is imported or

neo-synthesized when bacteria are grown without any protein overexpression. Evaluating the labeling pattern of the resulting isoleucine should give this information.

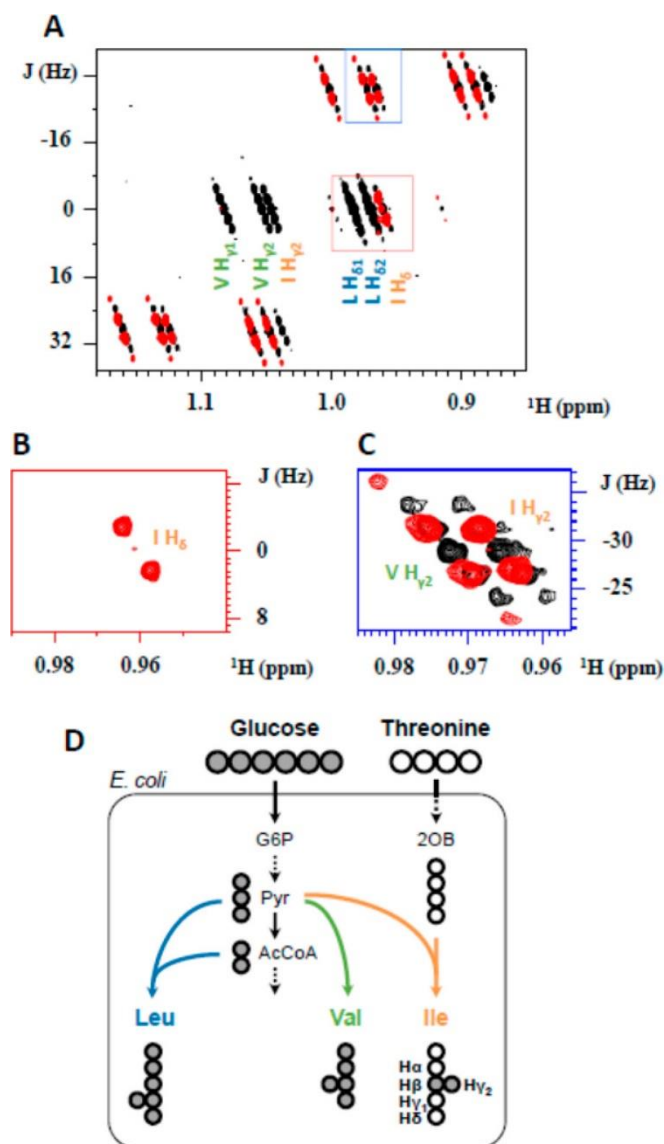


Figure 21 : (A) Superposition of the pure shift het-2DJ spectra of the bacterial lysates of a PT sample (black) and of the sample grown on $U\text{-}^{13}\text{C}$ glucose and unlabeled Thr (red). Val and Leu are uniformly ^{13}C labeled in the latter, but for Ile, the $C_{\gamma 2}$ but not the C_{δ} methyl is ^{13}C labeled. The splitting for the Ile H_{δ} methyl protons (B) and the Ile $H_{\gamma 2}$ methyl group (C) are in agreement with a heteronuclear J -coupling toward a common $^{13}\text{C}_{\beta}$ carbon and point to the $C_{\beta}\text{-}C_{\gamma 2}$ moiety coming from a pyruvate molecule that finds its origin in the $U\text{-}^{13}\text{C}$ labeled glucose, whereas the rest comes from the unlabeled threonine (D).

Wild type *E. coli* cells were grown on $U\text{-}^{13}\text{C}$ labeled glucose together with unlabeled threonine, whereby the latter is the precursor of the 2-oxobutanoate (2OB) intermediate that will give the Ile C_{δ} methyl group ([Figure S9](#)). Cells were harvested in exponential

phase and completely hydrolyzed by overnight incubation at 110 °C in 6 N HCl (Szyperski 1995). The resulting sample of proteinogenic amino acids was analyzed by the pure shift het-2DJ sequence (**Figure 21**). Leu and Val methyl protons show no correlations on the $J = 0$ Hz axis, confirming that their methyl groups are derived from the U- ^{13}C glucose. Moreover, the 1:2:2:1 fine structure of these methyl signals corresponds to the complete labeling of the neighboring carbons (C_α , C_β , and $\text{C}_{\gamma 2}$ for Val; C_β , C_γ , and $\text{C}_{\delta 2}$ for Leu) ([Figure S10](#)). The Ile H_δ methyl protons, in contrast, only show a peak at $J = 0$ Hz but none at $J = \pm 30$ Hz (**Figure 21 A,B**), confirming that even in the absence of protein overexpression, this C_δ position finds its origin solely in the unlabeled Thr. The splitting of 5.8 Hz for this $J = 0$ Hz peak, however, might come as a surprise. Whereas in the Pell-Keeler het-2DJ experiment this might be interpreted as a splitting due to a homonuclear coupling constant, the fact that it shows up in the pure shift het-2DJ experiment where all ^1H – ^1H coupling constants have been removed qualifies it unambiguously as a ^1H – ^{13}C long-range coupling constant. In the bacterial Ile biosynthesis, 2-oxobutanoate condenses with a pyruvate molecule to give the 2-aceto-hydroxybutyrate that then in three additional steps is transformed into Ile (**Figure 21 D** and [S9](#)). It thus is the ^{13}C labeled pyruvate molecule that provides the C_β carbon of Ile, explaining the $^3J_{\text{CH}}$ coupling constant that we observe. We furthermore observe the Ile $\text{H}_{\gamma 2}$ methyl protons exclusively off the $J = 0$ Hz axis (**Figure 21 C**), indicating that they are linked to a $\text{C}_{\gamma 2}$ carbon that is completely ^{13}C labeled and hence equally come from pyruvate. Its doublet structure comes from the $^2J_{\text{CH}}$ coupling to the $^{13}\text{C}_\beta$ carbon, confirming that pyruvate delivers a two-carbon block in the Ile biosynthesis. With the detailed information provided by the pure shift het-2DJ experiment, we thus not only confirm that the selective bacterial labeling of Ile is equally obtained in the absence of protein overexpression but also unravel a complex biosynthetic pathway such as that of isoleucine on the basis of a single spectrum on a single sample.

Conclusion

In conclusion, we have presented here novel NMR experiments that, by suppressing the homonuclear ^1H – ^1H couplings and putting the ^1H – ^{13}C coupling information orthogonal to the chemical shift information, largely improve isotopomer determination in samples of complex metabolite mixtures. Resolution enhancement by the Pell-Keeler het-2DJ experiment allows separation of overlapping signals by dispersing both the homo- and heteronuclear coupling constants along a -45° diagonal. Biomass derived samples can be analyzed with this experiment in a reasonable time despite the ca. 10-fold reduced SNR when compared to the het-2DJ experiment. When more detailed information about correlated isotope patterns are required, the pure shift het-2DJ experiment provides high-resolution access to the long-range heteronuclear coupling constants, albeit at the expense of increased measurement time. The absence of ^1H – ^1H couplings unleashes the full power of the long-range ^1H – ^{13}C couplings to detect and quantify the different isotopomers of metabolites, which as demonstrated for isoleucine biosynthesis, reveals biological information that is otherwise very challenging to obtain. The presented experiments are applicable to all metabolites and hence should contribute to our further understanding of metabolic fluxes.

Experimental Section

- **Organisms and Cultures**

Escherichia coli K-12 MG1655 wild type was selected for physiological experiments. Cells grown in LB media overnight at 37 °C were washed and transferred in M9 minimal medium complemented with 15 mM U-¹³C₆-glucose (Eurisotop, St. Aubin, France) with or without 4.5 mM L-threonine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Glucose, acetate, and thiamine were sterilized by filtration (0.2 µm, Sartorius), and the other compounds were autoclaved separately. Batch cultures were carried out in 250 mL baffled flasks (37 °C, 210 rpm) with 50 mL of medium.

Cell growth was monitored by measuring optical density at 600 nm with a Genesys 6 spectrophotometer (Thermo, Carlsbad, CA, USA). Extracellular glucose and threonine consumption were quantified in centrifuged broth, 5 min at 13 200g (Eppendorf centrifuge 5415D) by 1D proton NMR. 35 mL at OD of 2.1, before the end of the consumption of threonine, was centrifuged at 16 000g and washed, and the pellet was stored at -80 °C. Cell growth was monitored by measuring optical density at 600 nm with a Genesys 6 spectrophotometer (Thermo, Carlsbad, CA, USA).

- **Analysis of ¹³C-Labeled Acetate by NMR**

The ¹³C-acetate mixture used as label input for the production of the PT sample contains the four isotopic species of acetate in equal proportions, as previously described for the preparation of a mass spectrometry standard (Tavares *et al.* 2015). The proportions of each acetate form were measured by 1D ¹H NMR on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) equipped with a 5 mm z-gradient TCI probe head, using a *zgpr30* sequence with a relaxation delay of 20 s, at a temperature of 298 K.

A total of 64 scans were accumulated (64k points with a spectral width of 10 ppm) after 8 dummy scans. The experimental distribution of isotopic species (^{12}C -acetate: $25.0 \pm 0.5\%$; $1\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate: $25.0 \pm 0.5\%$; $2\text{-}^{13}\text{C}$ -acetate: $25.2 \pm 0.5\%$; $\text{U-}^{13}\text{C}$ -acetate: $24.8 \pm 0.5\%$) corresponds to a molecular ^{13}C -enrichment of $49.9 \pm 0.7\%$.

- **Sample Preparation for NMR Analyses**

Samples containing 15 mg of biomass were collected in midexponential growth phase. After centrifugation, the pellet was hydrolyzed in 6 N HCl (12 h at 100 °C) and dried by evaporation. Biomass hydrolysates were resuspended in 200 μL of D_2O with 0.1% HCl and introduced in a 3 mm tube. TMSP was added for proton referencing.

- **NMR Experiments**

NMR experiments were performed on a Bruker Avance III HD 800 MHz spectrometer equipped with a 5 mm QCP cryogenic probe head. Analyses were performed at 280 K. Spectra were acquired and processed using the Bruker Topspin 3.0 software. Details of all pulse sequences and protocols used for data analysis are given in the [Supporting Information](#).

2.5. Increasing field strength versus advanced isotope labeling for NMR-based fluxomics

Mickael Dinclaux,Edern Cahoreau,Pierre Millard,Fabien Létisse,Guy Lippens

TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

Magnetic Resonance in Chemistry, Volume 58, Issue 4 p. 305-311

Abstract

Nuclear magnetic resonance (NMR)-based fluxomics seeks to measure the incorporation of isotope labels in selected metabolites to follow kinetically the synthesis of the latter. It can however equally be used to understand the biosynthetic origin of the same metabolites. We investigate here different NMR approaches to optimize such experiments in terms of resolution and time requirement. Using the isoleucine biosynthesis as an example, we explore the use of different field strengths ranging from 500 MHz to 1.1 GHz. Because of the different field dependence of chemical shift and heteronuclear J couplings, the spectra change at different field strengths. We equally explore the approach to silence the leucine/valine methyl signals through the use of a suitable deuterated precursor, thereby allowing selective observation of the Ile ^{13}C labeling pattern. Combining both approaches, we arrive at an efficient procedure for the NMR-based exploration of Ile biosynthesis.

Introduction

The synthesis of organic molecules by living organisms heavily depends on enzymes as complex catalysts. Deciphering the exact pathway of multistep syntheses is not an easy task. One example is the biosynthesis of the branched chain amino acids (BCAAs), including leucine (Leu) and valine (Val) as well as isoleucine (Ile; **Figure 22**). Meticulous analysis of the intermediates of the latter Ile by the Umbarger laboratory has pointed to threonine (Thr) as the substrate of the threonine deaminase *IlvA*; the resulting keto-butyrate (KBU) then incorporates a two-carbon block from pyruvate to deliver the 2-aceto-2-hydroxybutyrate that subsequently undergoes three further steps before the final Ile is obtained (Adelberg and Umbarger 1953, Leavitt and Umbarger 1961, Umbarger and Adelberg 1951, Umbarger *et al.* 1960, Umbarger and Magasanik 1951). Completely different from its chemical synthesis (Marvel 1941), elucidating this biosynthetic pathway has been a heroic effort, relying heavily on radio-activity and careful separation of the products after chemical degradation of the precursors.

We recently described a method combining heteronuclear J-resolved NMR spectroscopy with pure-shift methodology to detect the level of enrichment for each site in the BCAAs in a single experiment (Sinnaeve *et al.* 2018). Using ^{13}C -labeled glucose and unlabeled Thr as sole carbon sources for the cell growth, we could show in a single experiment that the $\text{C}_\beta\text{--C}_{\gamma 1}$ block of isoleucine indeed comes from the ^{13}C -labeled glucose, whereas all other carbons find their origin in the unlabeled Thr. However, the pure-shift character of this experiment leads to a decreased sensitivity (Aguilar *et al.* 2015, Castanar and Parella 2015, Meyer and Zangger 2014) and further increases the dimensionality of the experiment from a 2D experiment for the heteronuclear J-resolved pulse sequence to a 3D experiment (Sinnaeve *et al.* 2018). As a result, the experiment requires at least a

night. This requirement becomes an important issue when multiple samples have to be analyzed, even though the amount of material or the concentration of the BCAAs in the bacterial hydrolysate is not directly the problem.

Although the elucidation of the biosynthetic pathways of the different amino acids

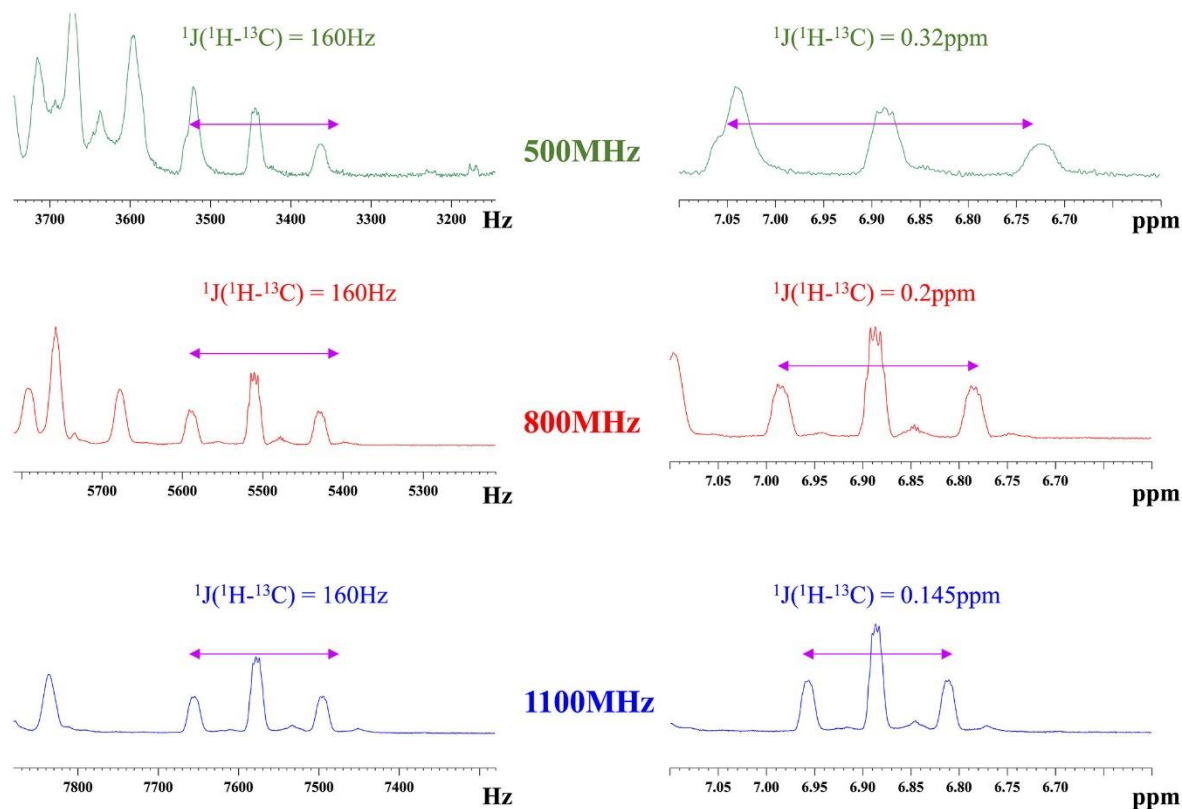


Figure 22 : Spectra of the Tyr H ϵ aromatic proton in the PT sample recorded at different field strengths. Spectra on the left or right hand sides are identical but are expressed in Hz on the left (thereby displaying the heteronuclear J-coupling as a conserved quantity) and in ppm on the right hand side, leading to an apparent reduction in J-coupling

and many other metabolites dates from last century, recent interest in synthetic biology has blown new life in comparable studies of the biosynthesis of natural metabolites. As an example, the *Escherichia coli* IlvA mutant cannot grow without supplementing Ile, but two recent reports have identified small synthetic proteins that allow to overcome this phenotype. The first report concerns a synthetic four-helix bundle protein (Fisher *et al.* 2011), whereas the second example identified an unrelated phage protein that equally allows rescue of the IlvA phenotype (Jerlstrom Hultqvist *et al.* 2018). Detailed

transcriptomics and metabolomics studies identified the latter phage protein as a S-adenosylmethionine (SAM) hydrolase. The consequent reduction of SAM levels leads to an increased expression of the promiscuous bacterial enzyme MetB, which can complement the absence of IlvA. In the case of the four-helix bundle, however, we still do not know how this synthetic protein can compensate for the absence of the essential IlvA enzyme. Exploring the function of unknown proteins such as the synthetic four-helix bundle protein might in principle be done through the analysis of multiple samples whereby ^{13}C -labeled glucose is combined with unlabeled precursors—individual or in mixture—before analysis of the ^{13}C incorporation at the different positions of the resulting Ile. However, whereas the bacterial growth and sample preparation can be performed in a parallel fashion on modern robotic platforms (Heux *et al.* 2014), the subsequent requirement of an overnight experiment for analysis of a single sample by NMR becomes a potential bottle neck. Knowing that on our robotic system, we can grow up to 48 cultures in parallel, NMR analysis times should remain below 1 hr to be compatible with the throughput of the culture.

We report here our efforts to optimize the NMR procedure for analysis of the labeling pattern of the resulting Ile molecules. We first use a lysate of a bacterial culture grown on an equimolar mixture of the four acetate isotopomers. Advantage of this sample (the “Pascal triangle” [PT] sample) is that we know that at every carbon position, the ^{12}C and ^{13}C carbon isotopes are equally abundant (Millard *et al.* 2017, Millard *et al.* 2014). The PT sample thereby leads to predictable spectra that can be used for validation purpose. We explore different field strengths to enhance resolution and present spectra at field strengths ranging from 11.74T to 23.48T (corresponding to a proton frequency from 500 MHz to 1.1 GHz). The differential field dependence of the chemical shift and J-coupling adds complexity to this approach and makes the sole use of higher field strengths to disentangle the coupling patterns less obvious. As for a second strategy, we show that

deuteration of the Leu/Val methyls through the use of a deuterated keto-isovalerate precursor can simplify the spectra in an important manner. Reduction of the dimensionality of the heteronuclear J-resolved pure-shift experiment thereby is possible. Exploiting simultaneously the field dependence previously described and the isotope labeling, we can obtain information of the Ile ^{13}C labeling pattern in a simple 1D spectrum.

RESULTS AND DISCUSSION

- **Differential field dependence of the chemical shift and J coupling**

Whereas the chemical shift (related to the nuclear Zeeman splitting (Zeeman 1897)) when expressed in Hz scales linearly with the externally applied magnetic field, the field independence of the scalar coupling was an important argument to its definition in the early days of NMR (Gutowsky *et al.* 1951, Hahn and Maxwell 1951, Hahn and Maxwell 1952). As a result, when the interactions are expressed in ppm as commonly done in present-day NMR, the situation is the inverse: The chemical shift differences expressed in ppm become field independent, whereas the apparent J-coupling expressed in ppm becomes nominally smaller as the external field increases. As an example, we show the NMR spectrum of the aromatic Tyr H ϵ proton in the PT bacterial lysate (**Figure 22**). As every carbon in this PT sample has a priori an equal chance of being a ^{12}C or ^{13}C , the proton shows up as a triplet, with a constant splitting of 160 Hz for the ^1H – ^{13}C 1J coupling at all three field strengths. When expressed in ppm, the splitting becomes smaller with increasing field strength. Indeed, the same 160 Hz represents 0.32 ppm on a 500-MHz instrument, whereas they adopt less than half of this value (0.145 ppm) on a 1.1-GHz spectrometer.

If we enlarge the spectral window to include other aromatic protons, we find that the chemical shift difference between the central (^{12}C bound) proton signals is field independent when expressed in ppm, but field dependent when expressed in Hz. As a direct consequence of the differential field dependence of both interactions, when we look at the ^{13}C carbon-linked satellites in the proton spectra at different field strengths, their separation becomes field dependent irrespectively when we use the Hz or ppm scale (**Figure 23**).

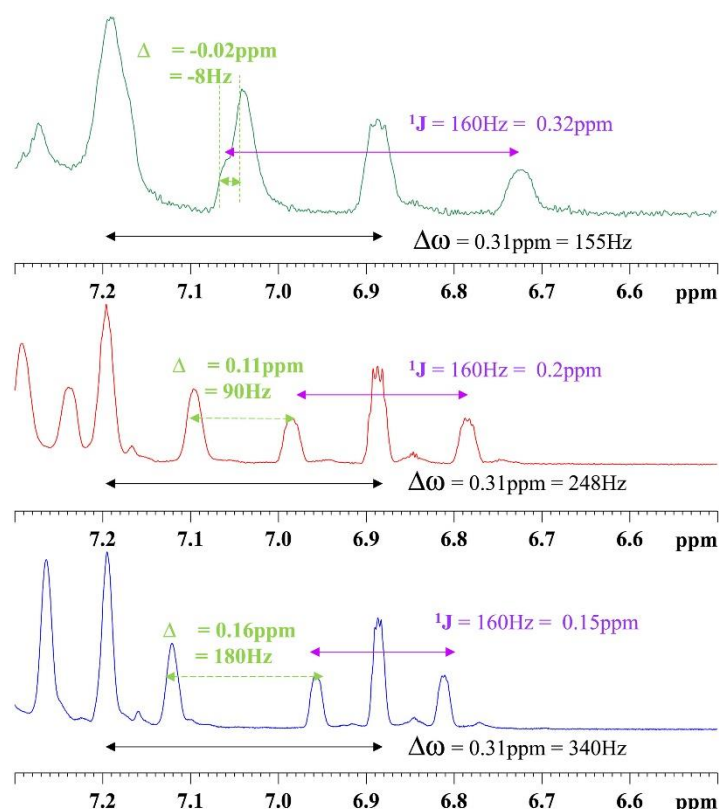


Figure 23 : Differential field dependence of chemical shift and J-coupling. The heteronuclear J-coupling (magenta) is field independent (160 Hz, for the aromatic ^1H – ^{13}C 1J coupling), but its apparent value when expressed in ppm becomes field dependent; the chemical shift ($\Delta\omega$, black) is field dependent but becomes constant when expressed in ppm. As a result, the separation between the satellite lines from different ^{13}C bound protons (Δ , green line) turns out field dependent irrespectively when expressed in Hz or ppm

As a result, ^{13}C incorporation at the ϵ position of Tyr can be measured directly at 800 and 1,100 MHz by comparing the integrated area of the central line of the triplet corresponding to the ^{12}C -linked H_ϵ protons to that of both satellites representing the ^{13}C -linked H_ϵ protons. Doing so, we find a ratio of $1:1.02 \pm 0.02$ and $1:1.01 \pm 0.01$ at 1,100 MHz and 800 MHz, respectively. At 500 MHz, overlap of one of the ^{13}C -linked H_ϵ satellites with a signal from the ^{13}C -linked Tyr H_δ proton hinders integration of both satellites. However, comparing the integrals of the central peak with twice that of the satellite at 6.72 ppm yields a ratio of $1:1.03 \pm 0.04$, in agreement with the expected 1:1 ratio for the PT sample.

- **The spectral region of the BCAA methyls at different field strength**

The spectra of the aromatic protons already point to the possible complexity of mixing field (in)dependent interactions. When we focus on the methyl region of the BCAAs, the mixture of field-dependent chemical shift and field-independent heteronuclear coupling constants leads to the odd situation whereby the spectra of the same sample recorded at different field strengths cannot even be recognized (**Figure 24**). A confounding factor thereby is that every peak not only shows the J-coupling to the directly attached carbon nucleus, but equally to all other carbons that are at two or three bonds away, as well as to the nearby protons. As a result, even though the sample is a bacterial lysate containing only isolated metabolites (including amino acids) with sharp signals for every isotopomer if one can remove the homonuclear couplings, the composite peaks appear as broad humps. This is confirmed when we extract from the heteronuclear pure shift J-resolved spectrum (Sinnaeve *et al.* 2018) the pure chemical shift of the ^{12}C -linked methyl protons in the absence of any heteronuclear or homonuclear couplings, where indeed we do observe the methyls as sharp peaks. We can thereby observe at 800 MHz a 9-Hz difference between the Ile H δ methyl signal and the closest Leu H δ neighbor. In order for this separation to reach the value of the heteronuclear ^1J coupling constant (126 Hz for the methyl ^1H - ^{13}C coupling), and hence to disentangle completely the triplet structure of the different methyl signals in a one-dimensional proton spectrum to a level that integration of the individual lines as done for the aromatic protons would become feasible, one would

need a field strength of 11.2 GHz, still an order of magnitude beyond what is currently possible.

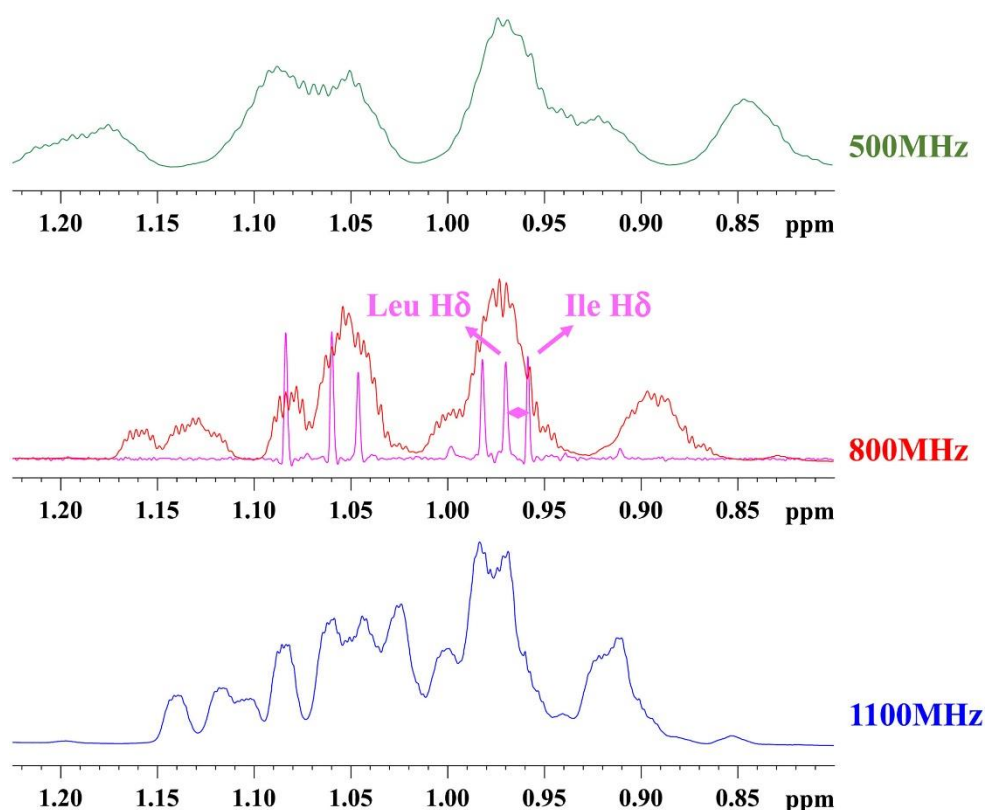


Figure 24 : Methyl region of the BCAAs at different field strength. The 6 methyl signals and their corresponding ^{13}C -linked satellites mix in such a manner that the spectra in this region of the same PT sample at different fields cannot be recognized. At 800 MHz, we show the trace at $J = 0$ Hz of the pure ^{12}C -linked protons after removal of the homonuclear coupling constants. The separation between the Ile $\text{H}\delta$ methyl and the closest Leu $\text{H}\delta$ methyl signals (magenta arrow) is 9 Hz

- **Erasing the Leu/Val methyl signals by selective deuteration**

As a complementary strategy to increasing field strengths, isotope labeling methods have been the second pillar of modern biomolecular NMR spectroscopy. The use of specifically labeled precursors (Goto *et al.* 1999) thereby has allowed methyl TROSY spectroscopy (Tugarinov *et al.* 2003), whereby deuteration of certain carbons alleviates the rapid relaxation rates encountered in the study of ever larger biomolecular complexes (Rosenzweig and Kay 2014, Wiesner and Sprangers 2015, Xu and Matthews 2013). For the BCAAs, the ^{13}C and/or ^2D labeling strategies are based on the knowledge that the

methylys of Leu and Val are derived from the keto-isovalerate precursor, whereas for Ile, its δ -methyl comes from the keto-butyrate and its γ -methyl from the pyruvate (**Figure 25**).

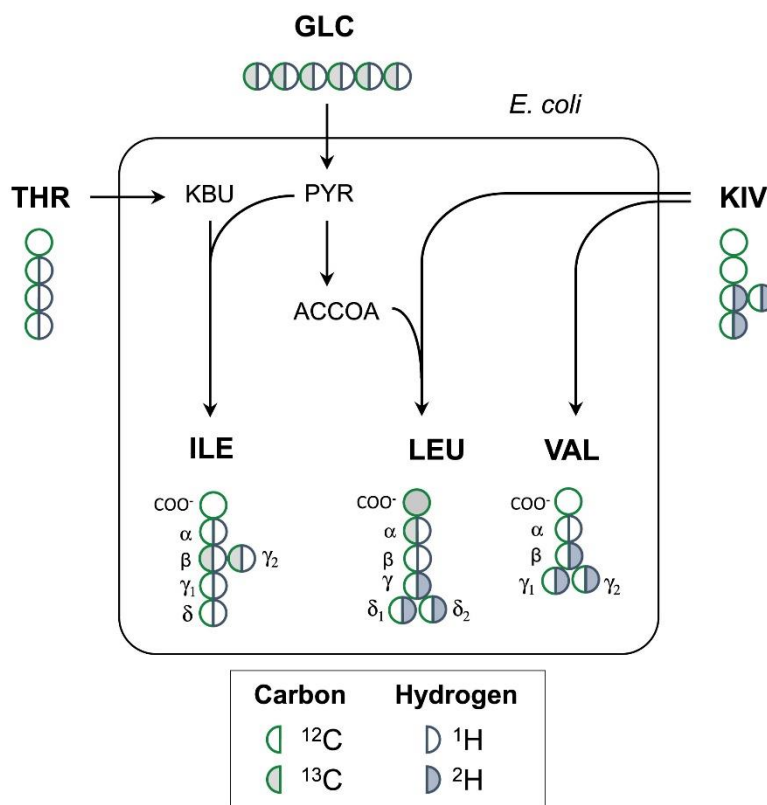


Figure 25 : Simplified metabolic network of *E. coli* showing the ^{13}C and ^2H labeling patterns of leucine (LEU), isoleucine (ILE), and valine (VAL) when $^{13}\text{C},^1\text{H}$ -glucose (GLC), $^{12}\text{C},^1\text{H}$ -threonine (THR), and $^{12}\text{C},^2\text{H}$ -ketoisovalerate (KIV) are used as label input. With this experimental setup, all methyl groups of leucine and valine (derived from KIV)—but not the ones of isoleucine originating from THR (for the δ methyl) or GLC (for the γ_2 methyl)—are deuterated. Blue and green half-circles represent hydrogen and carbon atoms, respectively, and empty/filled symbols represent light/heavy isotopes

In the present context of overlap between the different methylys of the BCAAs, knowing the distinct biosynthetic pathways for Leu/Val and Ile synthesis suggests the use of uniformly deuterated keto-isovalerate as a straightforward manner to focus solely on the ^{13}C labeling pattern of the Ile methyl groups without being obscured by the Leu/Val methyl signals. Deuteration hence is not used to lower the proton density and hence lengthen the transverse relaxation times, but to selectively erase the signals from Leu/Val methylys (**Figure 25**). When growing the same bacterial culture on uniformly deuterated

keto-isovalerate together with uniformly ^{13}C -labeled glucose and unlabeled Thr, the resulting proton spectrum of the lysate is indeed substantially simpler in the methyl region, suggesting that the Leu/Val methyls are efficiently deuterated (**Figure 26**). In order to remove the homonuclear coupling constants that still obscure the Ile methyl spectrum, we applied the SAPPHIRE pure shift sequence (Moutzouri *et al.* 2017) to the same sample. This lengthens the acquisition from 1 min to 50 min, still within the limit of 1 hr per sample, but efficiently removes the homonuclear coupling constants while efficiently suppressing side bands from the pure shift chunked acquisition. Whereas the pattern centered at 1.12 ppm indeed reduces to a doublet with a 4-Hz splitting, corresponding to the $^2J\ ^1\text{H}\text{--}^{13}\text{C}$ coupling constant of the ^{13}C -linked γ methyl protons with the $^{13}\text{C}_\beta$ carbon, the other component of the doublet appears as a triplet structure at 0.96 ppm. A pure shift heteronuclear J-resolved spectrum on the same sample explains this observation: One component of the ^{13}C -linked γ methyl doublet coincides by chance with its ^{12}C -linked δ methyl protons. The latter still appears as a doublet with a 4-Hz splitting as it couples via a 3J coupling constant to the $^{13}\text{C}_\beta$ of Ile.

Our previous understanding of the differential field dependence of chemical shifts and J couplings however suggests a straightforward manner to disentangle these two methyl protons signals. Indeed, recording the spectrum at a different field should influence only the chemical shift difference (as expressed in Hz) between the two methyl signals but not the heteronuclear 126 Hz 1J coupling of the γ methyl. When expressed in ppm, the chemical shift difference will be constant, but the J coupling will appear larger at lower fields. In the spectrum of the same sample recorded at 500 MHz, we indeed separate the Ile ^{13}C -linked γ methyl doublet from the ^{12}C -linked δ methyl signal (**Figure 26**). As a result, in the SAPPHIRE spectrum recorded at 500 MHz, we obtain the ^{13}C labeling pattern of the

Ile amino acid in a simple 1D spectrum—a doublet for the γ methyl and a singlet for the δ methyl—on a time scale compatible with tens of samples.

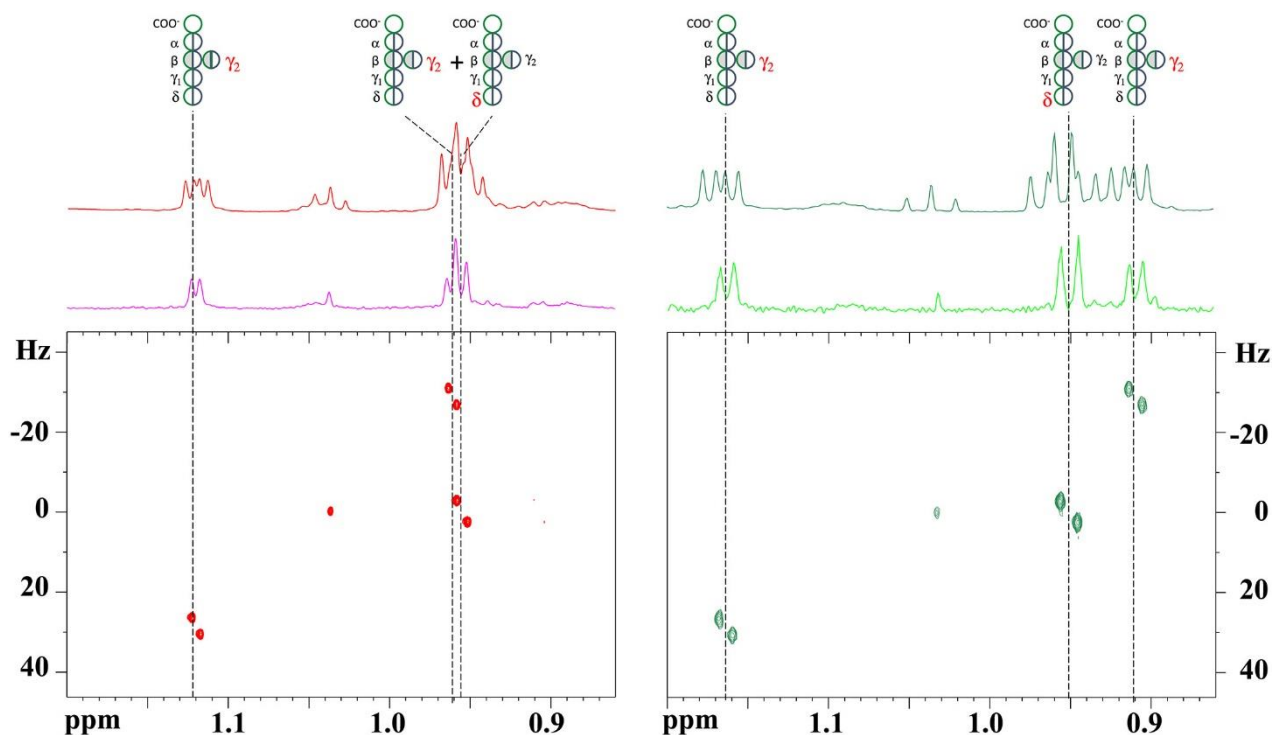


Figure 26 : Erasing the Leu/Val methyl signals through use of deuterated keto-isovalerate. The spectra of a lysate of a bacterial culture grown on deuterated keto-isovalerate, ^{13}C -labeled glucose, and unlabeled Thr are shown at 800 MHz (left, red) and 500 MHz (green, right). From top to bottom: standard one pulse experiment, SAPHIRE pure shift experiment, and 2D pure shift heteronuclear J-resolved spectra. As in **Figure 25**, blue and green half-circles represent hydrogen and carbon atoms, respectively, and empty/filled symbols represent light/heavy isotopes. Isoleucine methyl signals are assigned to specific protons labeled in red on the schematic Ile residues

CONCLUSION

We present here our efforts to render NMR analysis of the Isoleucine isotope labeling compatible with a medium throughput experiment. We explore increasing field strengths and an alternative labeling scheme to reduce the NMR acquisition time to below 1 hr. The use of deuterated keto-isovalerate to erase the Leu/Val signals together with a 500-MHz pure shift spectrum proves a reasonable option to derive the ^{13}C labeling pattern of the isoleucine in a time- and cost-effective manner. More generally, our study underscores the importance of exploring different options to simplify spectra for NMR-based fluxomics and confirms NMR as an analytical tool compatible with a medium throughput screen to find the biosynthetic origin of distinct metabolites.

EXPERIMENTAL SECTION

- **Organisms and cultures**

E. coli K-12 MG1655 wild type was selected for physiological experiments. For the PT sample, conditions were as described before (Millard *et al.* 2014). For the Leu/Val deuterated sample, cells grown in LB media overnight at 37°C were washed and transferred in M9 minimal medium complemented with 15-mM ¹²C-glucose and 6.5 mM of α-ketoisovalerate-D7 (NMR-Bio, Grenoble, France). Glucose, acetate, α-ketoisovalerate-D7, and thiamine were sterilized by filtration (0.2 μm, Sartorius), and the other compounds were autoclaved separately. Batch cultures were carried out in 250-ml baffled flasks (37°C, 210 rpm) with 50 ml of medium. Cell growth was monitored by measuring optical density at 600 nm with a Genesys 6 spectrophotometer (Thermo, Carlsbad, CA, USA). Forty-five milliliters at OD of 2.4, before the end of the consumption of threonine and α-ketoisovalerate-D7, was centrifuged at 16,000g and washed. After centrifugation, the pellet was hydrolyzed in 6 N HCl (12 hr at 100°C) and dried by evaporation.

- **Sample preparation for NMR analyses**

Biomass hydrolysates were resuspended in 200 μl of D₂O with 0.1% HCl and introduced in a 3-mm tube. TMSP was added for proton referencing.

- **NMR experiments**

NMR experiments were performed on a Bruker Avance III 800-MHz spectrometer equipped with a TCI cryogenic probe head or a 500-MHz Avance II spectrometer equipped with a TXI warm probe. The spectrum at 1.1 GHz was acquired on the instrument at Bruker (Fällanden, Switzerland) with a 3-mm TCI probe, on the same PT sample as was used for

the spectral recording at 500 and 800 MHz. The pure shift heteronuclear J-resolved spectra were acquired at 500 MHz and 800 MHz as described (Sinnaeve *et al.* 2018). The SAPHIRE spectrum was acquired with 2kx8x64 points and was processed as proposed by the authors (Moutzouri *et al.* 2017). Analyses were performed at 293 K. Spectra were acquired and processed using the Bruker Topspin 3.5pl7 software.

• ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. M. Mayzel (Bruker Biospin, Fällanden, Switzerland) for recording the spectrum at 1.1 GHz and Dr. R. Kerfah (NMR-Bio, Grenoble, France) for a generous gift of the deuterated α -ketoisovalerate-D7 precursor. Prof. M. Hecht (Princeton, USA) is thanked for insightful discussions. NMR spectrometers in Toulouse are supported by MetaToul (Toulouse Metabolomics & Fluxomics facilities, www.metatoul.fr) as part of the French National Infrastructure for Metabolomics and Fluxomics MetaboHUB-AR-11-INBS-0010 (www.metabohub.fr) and supported by the Région Midi-Pyrénées, the ERDF, the SICOVAL, and the French Minister of Education & Research, who are gratefully acknowledged.

- Adams, R. W., L. Byrne, P. Kiraly, M. Foroozandeh, L. Paudel, M. Nilsson, J. Clayden and G. A. Morris (2014). "Diastereomeric ratio determination by high sensitivity band-selective pure shift NMR spectroscopy." Chem Commun (Camb) **50**(19): 2512-2514.
- Adelberg, E. A. (2002). "Isoleucine Biosynthesis from Threonine1." Journal of the American Chemical Society **76**(16): 4241-4241.
- Adelberg, E. A. and H. E. Umbarger (1953). "Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. V. alpha-Ketoisovaleric acid accumulation." J Biol Chem **205**(1): 475-482.
- Aguilar, J. A., J. Cassani, M. Delbianco, R. W. Adams, M. Nilsson and G. A. Morris (2015). "Minimising research bottlenecks by decluttering NMR spectra." Chemistry **21**(17): 6623-6630.
- Amorim Franco, T. M. and J. S. Blanchard (2017). "Bacterial Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis: Structures, Mechanisms, and Drugability." Biochemistry **56**(44): 5849-5865.
- Berges, C., E. Cahoreau, P. Millard, B. Enjalbert, M. Dinclaux, M. Heuillet, H. Kulyk, L. Gales, N. Butin, M. Chazalviel, T. Palama, M. Guionnet, S. Sokol, L. Peyriga, F. Bellvert, S. Heux and J. C. Portais (2021). "Exploring the Glucose Fluxotype of the *E. coli* y-ome Using High-Resolution Fluxomics." Metabolites **11**(5).
- Bodenhausen, G., R. Freeman and D. L. Turner (1976). "Two-dimensional NMR spectroscopy: Proton-coupled carbon-13 NMR." The Journal of Chemical Physics **65**(2): 839-840.
- Cahoreau, E., L. Peyriga, J. Hubert, F. Bringaud, S. Massou and J. C. Portais (2012). "Isotopic profiling of (1)(3)C-labeled biological samples by two-dimensional heteronuclear J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy." Anal Biochem **427**(2): 158-163.
- Castanar, L., P. Nolis, A. Virgili and T. Parella (2013). "Full sensitivity and enhanced resolution in homodecoupled band-selective NMR experiments." Chemistry **19**(51): 17283-17286.
- Castanar, L. and T. Parella (2015). "Broadband ¹H homodecoupled NMR experiments: recent developments, methods and applications." Magn Reson Chem **53**(6): 399-426.
- Chong, M., A. Jayaraman, S. Marin, V. Selivanov, P. R. de Atauri Carulla, D. A. Tennant, M. Cascante, U. L. Gunther and C. Ludwig (2017). "Combined Analysis of NMR and MS Spectra (CANMS)." Angew Chem Int Ed Engl **56**(15): 4140-4144.
- DeBerardinis, R. J. and N. S. Chandel (2016). "Fundamentals of cancer metabolism." Sci Adv **2**(5): e1600200.
- Dinclaux, M., E. Cahoreau, P. Millard, F. Letisse and G. Lippens (2020). "Increasing field strength versus advanced isotope labeling for NMR-based fluxomics." Magn Reson Chem **58**(4): 305-311.
- Ducker, G. S. and J. D. Rabinowitz (2017). "One-Carbon Metabolism in Health and Disease." Cell Metab **25**(1): 27-42.
- Fan, T. W. and A. N. Lane (2016). "Applications of NMR spectroscopy to systems biochemistry." Prog Nucl Magn Reson Spectrosc **92-93**: 18-53.
- Fan, T. W. M. and A. N. Lane (2008). "Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **52**(2-3): 69-117.
- Fisher, M. A., K. L. McKinley, L. H. Bradley, S. R. Viola and M. H. Hecht (2011). "De novo designed proteins from a library of artificial sequences function in *Escherichia coli* and enable cell growth." PLoS One **6**(1): e15364.

- Foroozandeh, M., R. W. Adams, P. Kiraly, M. Nilsson and G. A. Morris (2015). "Measuring couplings in crowded NMR spectra: pure shift NMR with multiplet analysis." Chem Commun (Camb) **51**(84): 15410-15413.
- Foroozandeh, M., R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson and G. A. Morris (2014). "Ultrahigh-resolution NMR spectroscopy." Angew Chem Int Ed Engl **53**(27): 6990-6992.
- Freeman, R. and H. D. W. Hill (1971). "High-Resolution Study of NMR Spin Echoes: "J Spectra". " The Journal of Chemical Physics **54**(1): 301-313.
- Garcia Alonso, J. I. and P. Rodriguez-González (2013). Isotope dilution mass spectrometry. Cambridge, Royal Society of Chemistry.
- Giavalisco, P., K. Kohl, J. Hummel, B. Seiwert and L. Willmitzer (2009). "¹³C isotope-labeled metabolomes allowing for improved compound annotation and relative quantification in liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic research." Anal Chem **81**(15): 6546-6551.
- Goto, N. K., K. H. Gardner, G. A. Mueller, R. C. Willis and L. E. Kay (1999). "A robust and cost-effective method for the production of Val, Leu, Ile (delta 1) methyl-protonated ¹⁵N-, ¹³C-, ²H-labeled proteins." J Biomol NMR **13**(4): 369-374.
- Gutowsky, H. S., D. W. McCall and C. P. Slichter (1951). "Coupling among Nuclear Magnetic Dipoles in Molecules." Physical Review **84**(3): 589-590.
- Hackett, S. R., V. R. Zanutelli, W. Xu, J. Goya, J. O. Park, D. H. Perlman, P. A. Gibney, D. Botstein, J. D. Storey and J. D. Rabinowitz (2016). "Systems-level analysis of mechanisms regulating yeast metabolic flux." Science **354**(6311): aaf2786.
- Hahn, E. L. and D. E. Maxwell (1951). "Chemical Shift and Field Independent Frequency Modulation of the Spin Echo Envelope." Physical Review **84**(6): 1246-1247.
- Hahn, E. L. and D. E. Maxwell (1952). "Spin Echo Measurements of Nuclear Spin Coupling in Molecules." Physical Review **88**(5): 1070-1084.
- Hensley, C. T., B. Faubert, Q. Yuan, N. Lev-Cohain, E. Jin, J. Kim, L. Jiang, B. Ko, R. Skelton, L. Loudat, M. Wodzak, C. Klimko, E. McMillan, Y. Butt, M. Ni, D. Oliver, J. Torrealba, C. R. Malloy, K. Kernstine, R. E. Lenkinski and R. J. DeBerardinis (2016). "Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors." Cell **164**(4): 681-694.
- Heux, S., C. Berges, P. Millard, J. C. Portais and F. Letisse (2017). "Recent advances in high-throughput (¹³)C-fluxomics." Curr Opin Biotechnol **43**: 104-109.
- Heux, S., J. Poinot, S. Massou, S. Sokol and J. C. Portais (2014). "A novel platform for automated high-throughput fluxome profiling of metabolic variants." Metab Eng **25**: 8-19.
- Jerlstrom Hultqvist, J., O. Warsi, A. Soderholm, M. Knopp, U. Eckhard, E. Vorontsov, M. Selmer and D. I. Andersson (2018). "A bacteriophage enzyme induces bacterial metabolic perturbation that confers a novel promiscuous function." Nat Ecol Evol **2**(8): 1321-1330.
- Lane, A. N. and T. W. Fan (2017). "NMR-based Stable Isotope Resolved Metabolomics in systems biochemistry." Arch Biochem Biophys **628**: 123-131.
- Lane, A. N. and T. W. M. Fan (2007). "Quantification and identification of isotopomer distributions of metabolites in crude cell extracts using ¹H TOCSY." Metabolomics **3**(2): 79-86.
- Leavitt, R. I. and H. E. Umbarger (1961). "Isoleucine and valine metabolism in Escherichia coli. X. The enzymatic formation of acetohydroxybutyrate." J Biol Chem **236**: 2486-2491.

Lloyd, S. G., H. Zeng, P. Wang and J. C. Chatham (2004). "Lactate isotopomer analysis by ^1H NMR spectroscopy: consideration of long-range nuclear spin-spin interactions." Magn Reson Med **51**(6): 1279-1282.

Ludwig, C. and M. R. Viant (2010). "Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox." Phytochem Anal **21**(1): 22-32.

Luy, B. (2009). "Adiabatic z-filtered J-spectroscopy for absorptive homonuclear decoupled spectra." J Magn Reson **201**(1): 18-24.

Maaheimo, H., J. Fiaux, Z. P. Cakar, J. E. Bailey, U. Sauer and T. Szyperski (2001). "Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* explored by biosynthetic fractional (^{13}C) labeling of common amino acids." Eur J Biochem **268**(8): 2464-2479.

Marvel, C. J. O. S. (1941). "Preparation of diethyl sec-butylmalonate." **21**: 60.

Massou, S., C. Nicolas, F. Letisse and J. C. Portais (2007). "NMR-based fluxomics: quantitative 2D NMR methods for isotopomers analysis." Phytochemistry **68**(16-18): 2330-2340.

Meyer, N. H. and K. Zangger (2014). "Boosting the resolution of ^1H NMR spectra by homonuclear broadband decoupling." Chemphyschem **15**(1): 49-55.

Millard, P., E. Cahoreau, M. Heuillet, J. C. Portais and G. Lippens (2017). "(^{15}N)-NMR-Based Approach for Amino Acids-Based (^{13}C)-Metabolic Flux Analysis of Metabolism." Anal Chem **89**(3): 2101-2106.

Millard, P., S. Massou, J. C. Portais and F. Letisse (2014). "Isotopic studies of metabolic systems by mass spectrometry: using Pascal's triangle to produce biological standards with fully controlled labeling patterns." Anal Chem **86**(20): 10288-10295.

Millard, P., S. Sokol, M. Kohlstedt, C. Wittmann, F. Letisse, G. Lippens and J. C. Portais (2021). "IsoSolve: An Integrative Framework to Improve Isotopic Coverage and Consolidate Isotopic Measurements by Mass Spectrometry and/or Nuclear Magnetic Resonance." Anal Chem **93**(27): 9428-9436.

Moutzouri, P., Y. Chen, M. Foroozandeh, P. Kiraly, A. R. Phillips, S. R. Coombes, M. Nilsson and G. A. Morris (2017). "Ultraclean pure shift NMR." Chem Commun (Camb) **53**(73): 10188-10191.

Mueller, D. and E. Heinzle (2013). "Stable isotope-assisted metabolomics to detect metabolic flux changes in mammalian cell cultures." Curr Opin Biotechnol **24**(1): 54-59.

Paudel, L., R. W. Adams, P. Kiraly, J. A. Aguilar, M. Foroozandeh, M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sandor, J. P. Waltho and G. A. Morris (2013). "Simultaneously enhancing spectral resolution and sensitivity in heteronuclear correlation NMR spectroscopy." Angew Chem Int Ed Engl **52**(44): 11616-11619.

Pell, A. J. and J. Keeler (2007). "Two-dimensional J-spectra with absorption-mode lineshapes." J Magn Reson **189**(2): 293-299.

Ratcliffe, R. G. and Y. Shachar-Hill (2005). "Revealing metabolic phenotypes in plants: inputs from NMR analysis." Biol Rev Camb Philos Soc **80**(1): 27-43.

Rosenzweig, R. and L. E. Kay (2014). "Bringing dynamic molecular machines into focus by methyl-TROSY NMR." Annu Rev Biochem **83**(1): 291-315.

Ruiz, M., R. Gélinas, F. Vaillant, B. Lauzier and C. Des Rosiers (2015). Chapter Three - Metabolic Tracing Using Stable Isotope-Labeled Substrates and Mass Spectrometry in the Perfused Mouse Heart. Methods in Enzymology. C. M. Metallo, Academic Press. **561**: 107-147.

Simova, S., H. Sengstschmid and R. Freeman (1997). "Proton Chemical-Shift Spectra." Journal of Magnetic Resonance **124**(1): 104-121.

- Sinnaeve, D. (2018). "Clean pure shift 2D J-resolved spectroscopy." Magn Reson Chem **56**(10): 947-953.
- Sinnaeve, D., M. Dinclaux, E. Cahoreau, P. Millard, J. C. Portais, F. Letisse and G. Lippens (2018). "Improved Isotopic Profiling by Pure Shift Heteronuclear 2D J-Resolved NMR Spectroscopy." Anal Chem **90**(6): 4025-4031.
- Sinnaeve, D., M. Foroozandeh, M. Nilsson and G. A. Morris (2016). "A General Method for Extracting Individual Coupling Constants from Crowded (1)H NMR Spectra." Angew Chem Int Ed Engl **55**(3): 1090-1093.
- Strassman, M., A. J. Thomas, L. A. Locke and S. Weinhouse (2002). "Intramolecular Migration and Isoleucine Biosynthesis1." Journal of the American Chemical Society **76**(16): 4241-4242.
- Szyperski, T. (1995). "Biosynthetically directed fractional ¹³C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism." Eur J Biochem **232**(2): 433-448.
- Szyperski, T. (1998). "¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research." Q Rev Biophys **31**(1): 41-106.
- Szyperski, T., R. W. Glaser, M. Hochuli, J. Fiaux, U. Sauer, J. E. Bailey and K. Wuthrich (1999). "Bioreaction network topology and metabolic flux ratio analysis by biosynthetic fractional ¹³C labeling and two-dimensional NMR spectroscopy." Metab Eng **1**(3): 189-197.
- Tavares, L. C., I. Jarak, F. N. Nogueira, P. J. Oliveira and R. A. Carvalho (2015). "Metabolic evaluations of cancer metabolism by NMR-based stable isotope tracer methodologies." Eur J Clin Invest **45 Suppl 1**(s1): 37-43.
- Thrippleton, M. J. and J. Keeler (2003). "Elimination of zero-quantum interference in two-dimensional NMR spectra." Angew Chem Int Ed Engl **42**(33): 3938-3941.
- Tugarinov, V., P. M. Hwang, J. E. Ollerenshaw and L. E. Kay (2003). "Cross-correlated relaxation enhanced ¹H[π]¹³C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes." J Am Chem Soc **125**(34): 10420-10428.
- Tugarinov, V., R. Sprangers and L. E. Kay (2004). "Line narrowing in methyl-TROSY using zero-quantum ¹H-¹³C NMR spectroscopy." J Am Chem Soc **126**(15): 4921-4925.
- Umbarger, H. E. and E. A. Adelberg (1951). "The role of alpha-keto- beta-ethylbutyric acid in the biosynthesis of isoleucine." J Biol Chem **192**(2): 883-889.
- Umbarger, H. E., B. Brown and E. J. Eyring (1960). "Isoleucine and valine metabolism in Escherichia coli. IX. Utilization of acetolactate and acetohydroxybutyrate." J Biol Chem **235**: 1425-1432.
- Umbarger, H. E. and B. Magasanik (1951). "Isoleucine and valine metabolism of Escherichia coli. II. The accumulation of keto acids." J Biol Chem **189**(1): 287-292.
- van Winden, W. A., J. J. Heijnen and P. J. Verheijen (2002). "Cumulative bondomers: a new concept in flux analysis from 2D [¹³C,¹H] COSY NMR data." Biotechnol Bioeng **80**(7): 731-745.
- Wiesner, S. and R. Sprangers (2015). "Methyl groups as NMR probes for biomolecular interactions." Curr Opin Struct Biol **35**: 60-67.
- Wittmann, C. (2002). "Metabolic flux analysis using mass spectrometry." Adv Biochem Eng Biotechnol **74**: 39-64.
- Xu, Y. and S. Matthews (2013). "TROSY NMR spectroscopy of large soluble proteins." Top Curr Chem **335**: 97-119.

Ying, J., J. Roche and A. Bax (2014). "Homonuclear decoupling for enhancing resolution and sensitivity in NOE and RDC measurements of peptides and proteins." J Magn Reson **241**: 97-102.

Zamboni, N., S.-M. Fendt, M. Rühl and U. Sauer (2009). "¹³C-based metabolic flux analysis." Nature Protocols **4**: 878.

Zangger, K. (2015). "Pure shift NMR." Prog Nucl Magn Reson Spectrosc **86-87**: 1-20.

Zangger, K. and H. Sterk (1997). "Homonuclear Broadband-Decoupled NMR Spectra." Journal of Magnetic Resonance **124**(2): 486-489.

Zeeman, P. (1897). "The Effect of Magnetisation on the Nature of Light Emitted by a Substance." Nature **55**(1424): 347-347.

Zhang, M., X. W. Yu, Y. Xu, P. Jouhten, G. V. T. Swapna, R. W. Glaser, J. F. Hunt, G. T. Montelione, H. Maaheimo and T. Szyperski (2017). "¹³C metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown in aerobic batch cultures on glucose revealed high relative anabolic use of TCA cycle and limited incorporation of provided precursors of branched-chain amino acids." FEBS J **284**(18): 3100-3113.

3. Métabolisme de l'acétate au cours de la croissance d'*Escherichia coli* sur glucose

Il est établi depuis plus d'un siècle, qu'*E. coli* excrète de l'acétate lorsqu'elle pousse sur un excès de sucres fermentescibles (Harden 1901). Ce phénomène a été largement étudié en raison de son importance physiologique et applicative (Castano-Cerezo *et al.* 2009, Chong *et al.* 2013, Jian *et al.* 2010, Luli and Strohl 1990, O'beirne and Hamer 2000, Wolfe 2005). Chez *E. coli*, la principale voie de production d'acétate est constitutive et consiste en deux réactions en tandem, catalysées par la phosphate acétyl-transférase (Pta) et par l'acétate kinase (AckA). Ainsi, l'acétyl-coA est converti en acétyl-phosphate puis en acétate qui est alors excrété (Wolfe 2005). Une autre voie existe pour former de l'acétate consistant en la décarboxylation oxydative du pyruvate par la pyruvate oxydase PoxB (Abdel-Hamid *et al.* 2001, Chang *et al.* 1994). *E. coli* est également capable de consommer de l'acétate en aérobie, comme source de carbone et d'énergie pour soutenir la croissance. L'acétate peut être alors métabolisé par deux voies alternatives:

- 1) la voie Pta-AckA qui est réversible et qui fonctionnerait essentiellement en présence de forte concentration en acétate dans le milieu compte tenu de son affinité pour l'acétate ($K_M = 7-10$ mM) (Castano-Cerezo *et al.* 2009)
- 2) une voie fonctionnant en condition de faibles concentrations en acétate, irréversible et composée uniquement de l'acétyl-coA synthétase, Acs ($K_M = 200$ μ M) (Castano-Cerezo *et al.* 2009, Kumari *et al.* 2000, Kumari *et al.* 1995). Les deux voies conduisent dans tous les cas, à la formation d'acétyl-CoA (**Figure 27**).

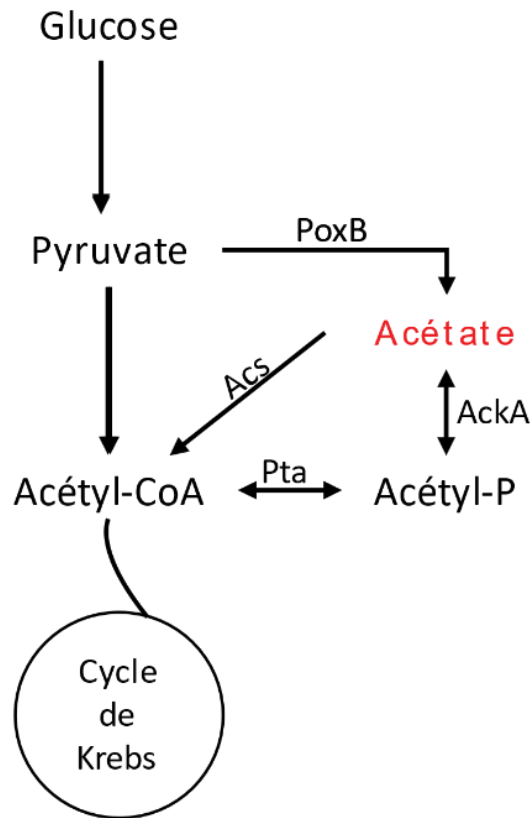


Figure 27: Voie de production / assimilation de l'acétate chez *E. coli*. PoxB : Pyruvate oxydase (EC : 1.2.5.1), AckA : Acetate kinase (EC : 2.7.2.1), Pta : phosphate acétyltransférase (EC : 2.3.1.8), Acs : acetyl-CoA synthétase (EC : 6.2.1.1).

En condition d'excès de glucose, *E. coli* se développe en produisant de l'acétate, qui sera consommé une fois le glucose totalement utilisé (Wolfe 2005). Ce comportement est qualifié de diauxique lorsque la consommation du second substrat s'accompagne d'une croissance. Dans le cas de la croissance aérobie d'*E. coli*, le comportement diauxique est expliqué par la répression catabolique exercée par le glucose sur l'utilisation de l'acétate. Lorsque le glucose est en excès, la composante protéique EIIA du système phosphoénolpyruvate-glucose phosphotransférase (PTS), le principal système de transport du glucose chez *E. coli*, est principalement sous sa forme non phosphorylée. Cela conduit à l'inhibition de l'adénylate cyclase, CyaA. Par

conséquent, les niveaux intracellulaires d'AMPc sont faibles et la protéine CRP (cAMP receptor Protein) ne se complexe avec l'AMPc. Dans cette situation, ce facteur de transcription, nécessaire à la transcription d'*acs* parmi d'autres gènes, est inactif. La répression de l'expression d'*acs* empêche alors la consommation d'acétate pendant la période de croissance sur glucose. En l'absence de glucose par contre, l'AMPc est formé via CyaA qui peut se lier à CRP et déclencher l'expression d'*acs*, permettant aux cellules de consommer de l'acétate.

Conformément au contrôle de l'expression d'*acs*, la consommation simultanée d'acétate et de glucose n'est observée que lorsque la répression catabolique est partiellement altérée (Flores *et al.* 2005) ou réduite (Castano-Cerezo *et al.* 2015, Renilla *et al.* 2012, Valgepea *et al.* 2010, Valgepea *et al.* 2011). Dans ces conditions, *acs* est exprimé et l'acétyl-CoA synthétase est active, permettant la consommation d'acétate. L'activité d'Acs, en concert avec l'activité de la voie Pta-AckA, conduit à la mise en place d'un cycle métabolique (cycle Pta-AckA-Acs) dans lequel l'acétate produit à partir de glucose par Pta-AckA peut être utilisé par Acs (Renilla *et al.* 2012, Valgepea *et al.* 2010, Valgepea *et al.* 2011). Ce cycle conduit à la production et à la consommation d'acétate de manière simultanée.

Du fait de la répression catabolique, la consommation simultanée de glucose et d'acétate ne devrait normalement pas se produire. Cependant, il a été récemment observé que l'acétate peut être absorbé et métabolisé lors de la croissance exponentielle d'une souche *E. coli* K-12 sur un mélange de glucose et d'acétate (Kotte *et al.* 2014). Cette observation a été faite dans des conditions d'excès de glucose. La capacité d'*E. coli* à consommer de l'acétate dans de telles conditions est très surprenante car *acs* n'est pas exprimé en raison de la répression catabolique. Par

conséquent, ces résultats suggèrent que la répression catabolique ne soit pas la seule déterminant de l'utilisation de l'acétate chez *E. coli*.

Le premier objectif de cette étude était donc de préciser la voie par laquelle l'acétate est consommé lors de la croissance en excès de glucose, i.e. condition de répression catabolique. Le second objectif était d'identifier le(s) mécanisme(s) qui contrôle(nt) le métabolisme de l'acétate dans de telles conditions. Ces questions ont été élucidées par une approche de marquage dynamique au ^{13}C (**2. Développement méthodologique**) pour quantifier les flux de production et de consommation d'acétate individuellement, et pour identifier les voies métaboliques assurant les flux. Les résultats obtenus lors de cette étude ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans Scientific report et intitulé : Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway (Enjalbert *et al.* 2017).

**3.1. Acetate fluxes in Escherichia coli are determined by
the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway**

Brice Enjalbert*, Pierre Millard*, Mickael Dinclaux, Jean-Charles Portais &
Fabien Létisse

LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France. *These
authors contributed equally to this work

Scientific Reports volume 7, Article number: 42135 (2017)

Abstract

Escherichia coli excretes acetate upon growth on fermentable sugars, but the regulation of this production remains elusive. Acetate excretion on excess glucose is thought to be an irreversible process. However, dynamic ^{13}C -metabolic flux analysis revealed a strong bidirectional exchange of acetate between *E. coli* and its environment. The Pta-AckA pathway was found to be central for both flux directions, while alternative routes (Acs or PoxB) play virtually no role in glucose consumption. Kinetic modelling of the Pta-AckA pathway predicted that its flux is thermodynamically controlled by the extracellular acetate concentration *in vivo*. Experimental validations confirmed that acetate production can be reduced and even reversed depending solely on its extracellular concentration. Consistently, the Pta-AckA pathway can rapidly switch from acetate production to consumption. Contrary to current knowledge, *E. coli* is thus able to co-consume glucose and acetate under glucose excess. These metabolic capabilities were confirmed on other glycolytic substrates which support the growth of *E. coli* in the gut. These findings highlight the dual role of the Pta-AckA pathway in acetate production and consumption during growth on glycolytic substrates, uncover a novel regulatory mechanism that controls its flux *in vivo*, and significantly expand the metabolic capabilities of *E. coli*.

Introduction

More than a century ago, Harden reported that the enterobacterium *Escherichia coli* excretes acetate when growing on excess fermentable sugars (Harden 1901). This phenomenon has been extensively investigated due to its physiological and applicative importance (Castano-Cerezo *et al.* 2009, Chong *et al.* 2013, Jian *et al.* 2010, Luli and Strohl 1990, O'beirne and Hamer 2000, Wolfe 2005). In *E. coli*, the main, constitutive, pathway of acetate production involves a combination of the phosphate acetyl-transferase (Pta) and acetate kinase (AckA). This way, acetyl-coA is converted into acetyl-phosphate then into acetate which is excreted (Wolfe 2005). Another route to form acetate is through oxidative decarboxylation of pyruvate by pyruvate oxidase PoxB (Abdel-Hamid *et al.* 2001, Chang *et al.* 1994). *E. coli* is also able to consume acetate as a carbon and energy source to support growth. Acetate can be metabolized by two alternative pathways: the reversible Pta-AckA pathway (a low affinity route with a K_M for acetate of 7–10 mM) (Castano-Cerezo *et al.* 2009, Kakuda *et al.* 1994), or the high affinity, irreversible acetyl-coA synthetase, Acs (with a K_M for acetate of 200 μ M) (Castano-Cerezo *et al.* 2009, Kumari *et al.* 2000, Kumari *et al.* 1995). Both pathways lead to the formation of acetyl-CoA (**Figure 28**).

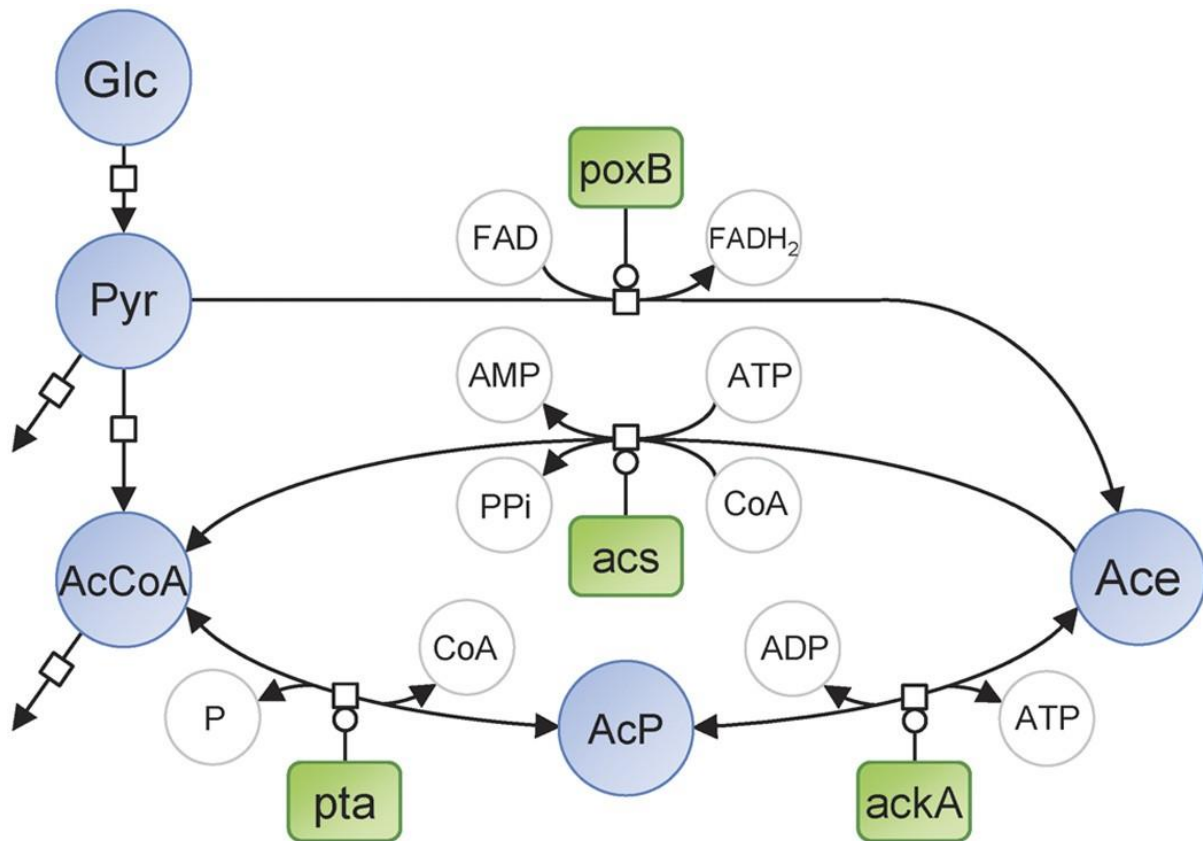


Figure 28 : Representation of *E. coli* pathways involved in acetate metabolism, in **Systems Biology Graphical Notation** format (<http://sbgn.org>) (Novère et al. 2009).

E. coli cells growing on excess glucose produce acetate but consume it only after the glucose is totally consumed (Wolfe 2005). This diauxic behavior is due to the catabolite repression exerted by glucose on acetate utilization. When glucose is in excess, the EIIA component of the phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system PTS (the main glucose transport system in *E. coli*), mostly exists in its unphosphorylated form. This leads to the inhibition of adenyl cyclase. Therefore cAMP levels are low and the transcriptional activator cAMP receptor protein (CRP), which is needed to transcribe *acs*, is inactive. The repression of *acs* expression prevents acetate consumption during the period of growth on glucose. In the absence of glucose, cAMP is produced and binds to CRP, which leads to *acs* expression and allows cells to consume acetate.

Consistent with the control of *acs* expression, simultaneous consumption of acetate and glucose is observed when catabolite repression is partially impaired (Flores *et al.* 2005) or weakened (Castano-Cerezo *et al.* 2015, Renilla *et al.* 2012, Valgepea *et al.* 2010, Valgepea *et al.* 2011). In these conditions, *acs* is expressed and acetyl-CoA synthetase (Acs) is active, enabling acetate consumption to occur. The activity of Acs, in concert with the constitutive activity of Pta and AckA, results in setting up a metabolic cycle (Pta-AckA-Acs cycle) in which the acetate produced from glucose by Pta-AckA can be utilized by Acs (Renilla *et al.* 2012, Valgepea *et al.* 2010, Valgepea *et al.* 2011). This cycle leads to the simultaneous production and consumption of acetate.

Due to catabolite repression, the simultaneous consumption of glucose and acetate is normally expected not to occur. However, it was recently observed that acetate can be taken up and metabolized during exponential growth of wild-type *E. coli* K-12 strains on a mixture of glucose and acetate (Kotte *et al.* 2014). This observation was made in conditions of glucose excess. The ability of *E. coli* K-12 to consume acetate in such conditions is highly intriguing since *acs* is not expressed due to catabolite repression. This observation suggests acetate can still be utilized by another pathway upon glucose excess. Hence, it is likely that catabolite repression is not the unique determinant of acetate utilization in *E. coli*.

The first objective of this study was therefore to clarify the pathway by which acetate is consumed upon growth on excess glucose, i.e. in conditions of catabolite repression. The second objective was to identify the mechanism(s) that control(s) acetate metabolism in such conditions. To address these questions, we designed and carried out dynamic ¹³C-labeling experiments to quantify acetate production and consumption fluxes individually, and to identify the metabolic pathways supporting the

fluxes. The results pointed out that the Pta-AckA pathway was responsible for both fluxes, and thermodynamic and kinetic *in silico* analyses suggested this pathway is thermodynamically controlled *in vivo* by extracellular acetate level. The proposed regulatory mechanism was validated experimentally on glucose and two other glycolytic substrates (gluconate and fucose). To evaluate the strength of the regulatory mechanism, experiments were carried out in conditions for which catabolite repression exerts its control on acetate metabolism, i.e. in batch cultures of the *E. coli* K-12 wild-type strain growing on excess glucose or on mixtures of glucose and acetate. The findings of this study have broad implications in our understanding of *E. coli* metabolism and its regulation.

Results

- **Acetate enters the TCA cycle during growth on glucose**

We first verified that excretion and uptake of acetate actually occur simultaneously when *E. coli* K-12 MG1655 cells were grown on minimal medium supplemented with 15 mM glucose. Small amounts of uniformly ^{13}C -labeled acetate were added to the cultures either in mid-exponential growth phase – during which acetate accumulated in the culture medium – or after glucose exhaustion, during which acetate is consumed. When ^{13}C -acetate was added during the latter phase, incorporation of the ^{13}C -label was observed in virtually all central carbon metabolites (**Figure 29**). This includes not only intermediates of the TCA cycle, but also intermediates of carbohydrate pathways, indicating that acetate feeds both oxidative metabolism and gluconeogenesis in these conditions, as expected. When ^{13}C -acetate was added during exponential growth on glucose, incorporation of ^{13}C label was observed in TCA cycle intermediates, indicating assimilation of the exogenously supplied acetate. No ^{13}C label was incorporated into intermediates of glycolysis, which is consistent with a low – if any – gluconeogenic activity in this condition. These results confirmed that extracellular acetate can enter into the cell and be metabolized even on excess glucose (Kotte *et al.* 2014). This utilization of acetate occurs while acetate was accumulating in the culture medium at the same time. In other words, the net accumulation of acetate in the medium upon glucose metabolism results from the balance between acetate production and acetate consumption, revealing the existence of a permanent and bidirectional exchange of acetate between the cells and the medium.

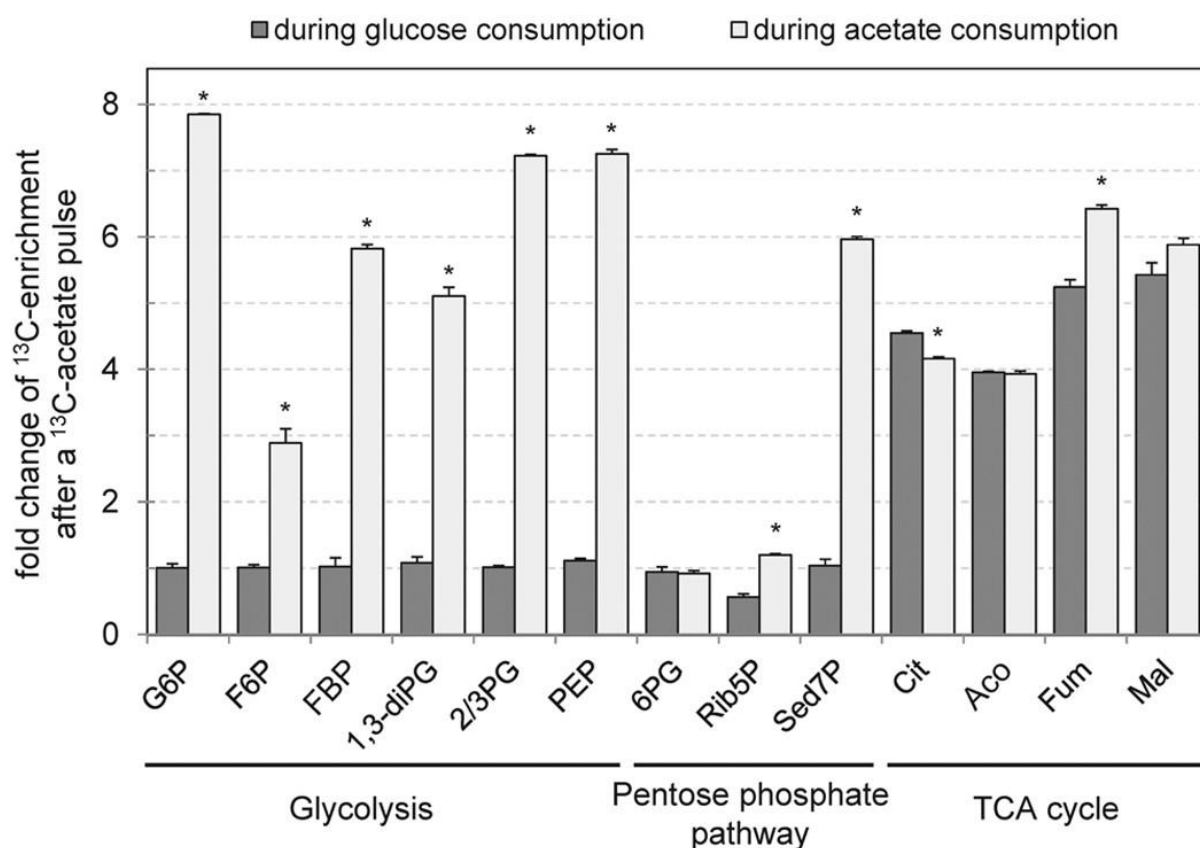


Figure 29 : Incorporation of ^{13}C atoms in central metabolites after a pulse of ^{13}C -acetate during exponential growth on glucose or during the acetate consumption phase.

- **Acetate is simultaneously produced and utilized via the Pta-AckA pathway**

To evaluate the magnitude of the acetate exchange between cells and medium under excess glucose, we measured the separate unidirectional fluxes of acetate production and of acetate consumption. A dynamic ^{13}C -labeling experiment was carried out by growing *E. coli* on minimal medium containing a binary mixture of 15 mM U- ^{13}C -glucose with 1 mM unlabeled acetate (**Figure 30 A**). While the concentration of uniformly labeled acetate (produced from glucose) increased along growth as a result of the production of acetate from glucose, the initial unlabeled pool decreased with time. A model was developed to simulate the labelling dynamics (**Figure 30 B**), in

which the evolutions of the labeled and unlabeled pools of acetate were described as separate ODEs (see Methods section). The unidirectional fluxes of acetate production and acetate consumption were calculated by fitting the experimental data with the model. Acetate production and consumption were measured to be 7.7 ± 0.5 and $5.7 \pm 0.5 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectively. The values of the unidirectional fluxes were three- to four-fold higher than the net acetate accumulation rate ($2.2 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and were of the same order of magnitude as the specific glucose consumption rate (**Figure 30 C**).

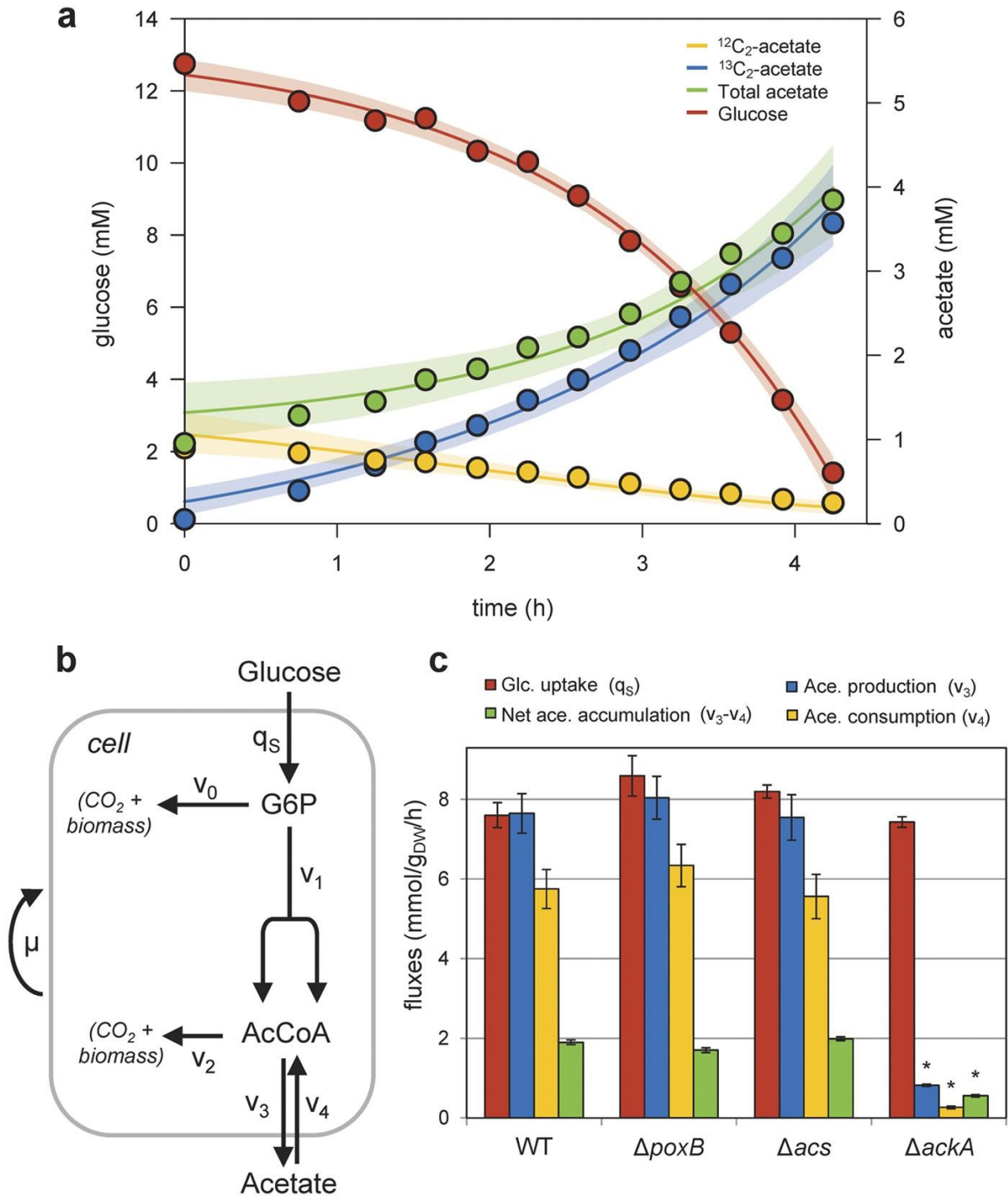


Figure 30 : Quantification of acetate consumption and production fluxes by dynamic ^{13}C -metabolic flux analysis.

The two pathways involved in acetate metabolism (*i.e.* the Pta-AckA and the Acs pathways) have different cofactor requirements (**Figure 28**). The net cofactor

balance of the complete acetyl-CoA/acetate cycle depends on the metabolic routes that are used for acetate production and acetate consumption, respectively. These routes can ultimately have an impact on the cellular energy balance. This is known to occur under glucose limitation, where acetate production via Pta-AckA and re-consumption via Acs lead to an energy-dissipating cycle, with a net balance of one ATP hydrolyzed into ADP per acetyl-coA recycled (Valgepea *et al.* 2010). Assuming the simultaneous production and consumption of acetate observed in our study occurs entirely via the Pta-AckA-Acs cycle, the corresponding ATP expenditure would represent up to $5.7 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, *i.e.* 16% of the overall ATP needs of the cell (Orth *et al.* 2011). To evaluate the actual impact of the simultaneous acetate production and consumption on cellular energetics, the contribution of each route to acetate production or consumption were quantified in strains deleted for enzymes from each pathway (ΔpoxB , Δacs and ΔackA ; **Figure 30 C**). The net acetate accumulation fluxes in the Δacs and ΔpoxB strains were similar to those of the wild-type. Consistently, the unidirectional fluxes of acetate production and acetate consumption were similar in the three strains. In contrast, the net accumulation of acetate in the ΔackA strain was reduced by 71% compared to the wild-type. In this mutant, the unidirectional fluxes of acetate production and acetate consumption were reduced by about 90% compared to the wild-type. These data demonstrate that neither Acs nor PoxB play a role in acetate consumption in this condition while the Pta-AckA pathway can be responsible for both acetate production and acetate consumption. The latter pathway alone is sufficient to maintain a significant bidirectional flux of acetate. Contrary to the Pta-AckA-Acs cycle, this bidirectional process does not result in ATP wasting, and hence should have a minor impact on the ATP balance in *E. coli*.

- ***E. coli* can consume acetate and glucose simultaneously**

The bidirectional flux of acetate, due to the reversibility of the Pta-AckA pathway, suggested that increasing extracellular acetate concentration could move the balance towards lower acetate production, and possibly towards net acetate consumption. If so, then extracellular concentration of acetate in the medium would decline. The free energy of the pathway ($\Delta G_{\text{Pta-AckA}}$) was calculated from the concentrations of relevant metabolites (see Methods). The sign of $\Delta G_{\text{Pta-AckA}}$ changed when acetate concentrations reached 6 mM, indicating that the net acetate flux could be reversed under the physiological range of metabolite concentrations. To get more quantitative insights into this question, a kinetic model of the Pta-AckA pathway was developed using parameters measured in this study or obtained from the literature (**Figure 31 A**; see Methods). This model was used to simulate the operation of the pathway for a wide range of acetate concentrations (from 10 μM to 100 mM). Consistent with experimental observations, the model predicted the accumulation of acetate in the medium at low acetate concentrations (below 10 mM). The Pta-AckA flux was predicted to decrease non-linearly when the acetate concentration increased, and then to reverse for acetate concentrations above 10 mM, resulting in net acetate consumption (**Figure 31 A**).

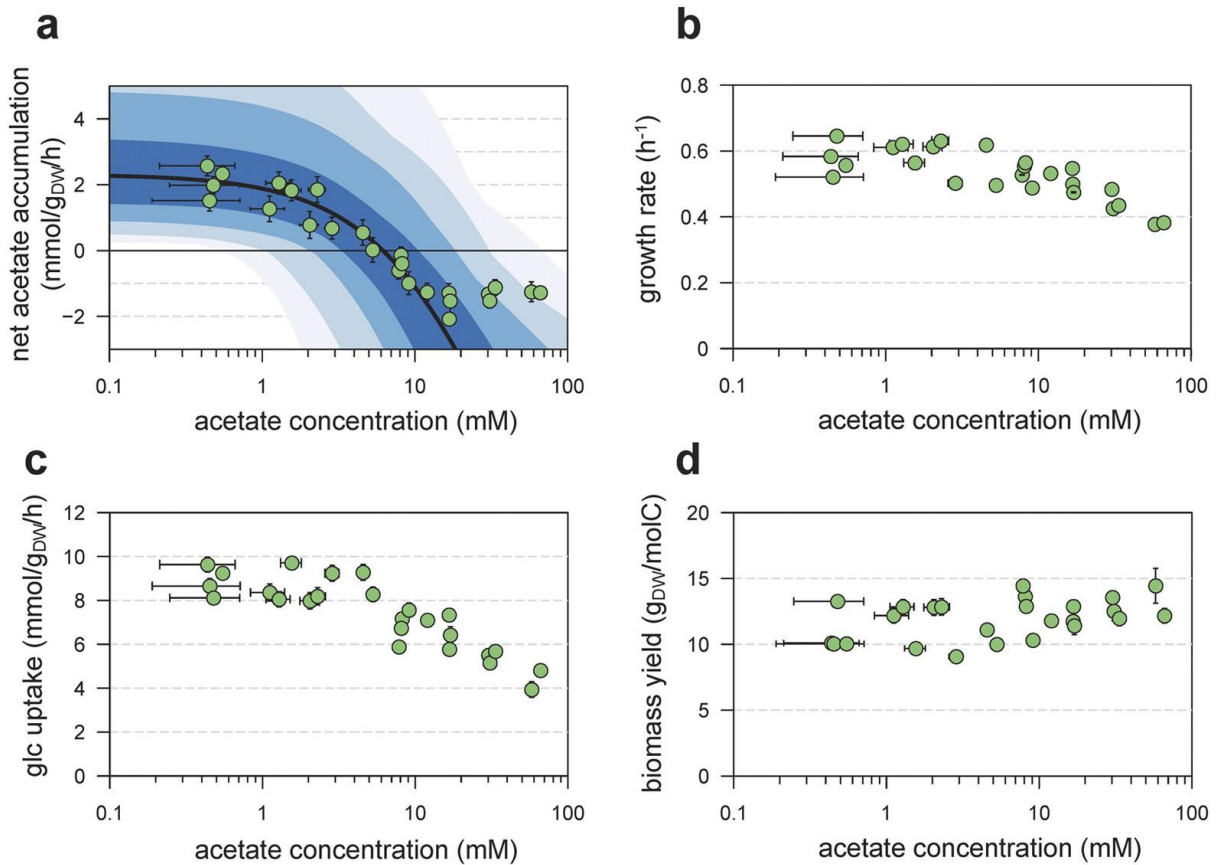


Figure 31 : *In silico* analysis of the Pta-AckA pathway, and experimental validation of model predictions. The steady-state flux through the Pta-Ack pathway was simulated for different acetate levels (panel a, black line), with kinetic parameters taken from the literature and concentrations of ADP, ATP, CoA, acetyl-CoA and phosphate set to experimental values. To investigate the robustness of these predictions, sensitivity analysis was carried out by uniformly sampling all concentrations and parameters within $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$ and $\pm 40\%$ of their experimental values (dark blue to light blue, respectively). These predictions were compared to experimental values (green dots). Experimental growth rates (b), glucose uptake rates (c) and growth yields (d) for different acetate levels.

The predictions were tested experimentally by growing *E. coli* on minimal medium supplemented with glucose plus different concentrations of acetate (from 0.1 mM to 64 mM). Growth rate μ , specific glucose consumption rate q_{Glc} , and specific acetate production rate q_{ac} , were estimated for each condition (Figure 31 A-C). Growth rates and q_{Glc} were stable for acetate concentrations up to 8 mM (Figure 31 B-C), and then monotonously decreased as acetate concentration increased, consistently with previous reports (Luli and Strohl 1990, Xu *et al.* 1999). In contrast, q_{ac} dropped as soon as the acetate extracellular concentration was above

1 mM (**Figure 31 A**). At an initial acetate concentration of 5.5 mM, q_{ac} reached zero meaning that acetate no longer accumulated in the culture medium. This is in excellent agreement with the value of 6 mM predicted by the kinetic model. Above the threshold concentration of 5.5 mM, q_{ac} was negative indicating that the extracellular concentration of acetate decreased in the culture medium. At acetate concentrations above 32 mM, acetate uptake was stabilized at $1.7 \pm 0.3 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$, which is lower than the predicted value (**Figure 31 B**). This may indicate saturation of acetate uptake or strong feedback inhibition by the rest of metabolism. These data also mean that glucose and acetate can be co-consumed by *E. coli*.

Exposure of *E. coli* cells to high acetate concentrations results in decreased growth rates while the growth yield $Y_{X/S}$ remains constant (**Figure 31 D**). This confirms that the bidirectional operation of the Pta-AckA pathway does not massively dissipate energy otherwise one could expect a reduced growth yield.

- **The Pta-AckA pathway supports acetate consumption in the presence of glucose**

To confirm that the Pta-AckA pathway is actually responsible for acetate consumption under excess glucose, the net flux of acetate accumulation, and the unidirectional fluxes of acetate production and acetate consumption were measured in the wild-type, Δacs , $\Delta poxB$, and $\Delta ackA$ strains for different acetate concentrations (**Figure 32**). As observed above, the net accumulation of acetate in the wild-type strain reversed to a net consumption when acetate concentration was 8 mM or above (**Figure 32 A**). The behavior of the $\Delta poxB$ and Δacs strains was similar to that of the wild-type, *i.e.* a shift from net accumulation to net consumption with increasing acetate concentrations. The net acetate accumulation rates were 1.7 ± 0.1 and

$2.0 \pm 0.1 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at 1 mM of acetate and shift to -1.8 ± 0.1 and $-1.5 \pm 0.1 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ at 32 mM of acetate for Δacs and ΔpoxB strains respectively (**Figure 32 A**). In contrast, the *ackA* deletion virtually abolished both acetate production and consumption fluxes (**Figure 32 B-C**), under all tested acetate concentrations. A weak acetate accumulation ($0.6 \pm 0.2 \text{ mmol.g}_{\text{DW}}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was still observed in this mutant (**Figure 32 A-B**). This production can be due to the AckA independent transfer of phosphate by acetyl-P resulting in acetate formation (Phue *et al.* 2010) or to the operation of biosynthetic pathways (methionine, cysteine, arginine, etc.) in which acetate is a metabolic by-product (Valgepea *et al.* 2010). These results confirmed that, in the range of acetate concentrations tested, the Pta-AckA pathway is responsible for both the production and consumption of acetate, with no significant role of Acs and PoxB.

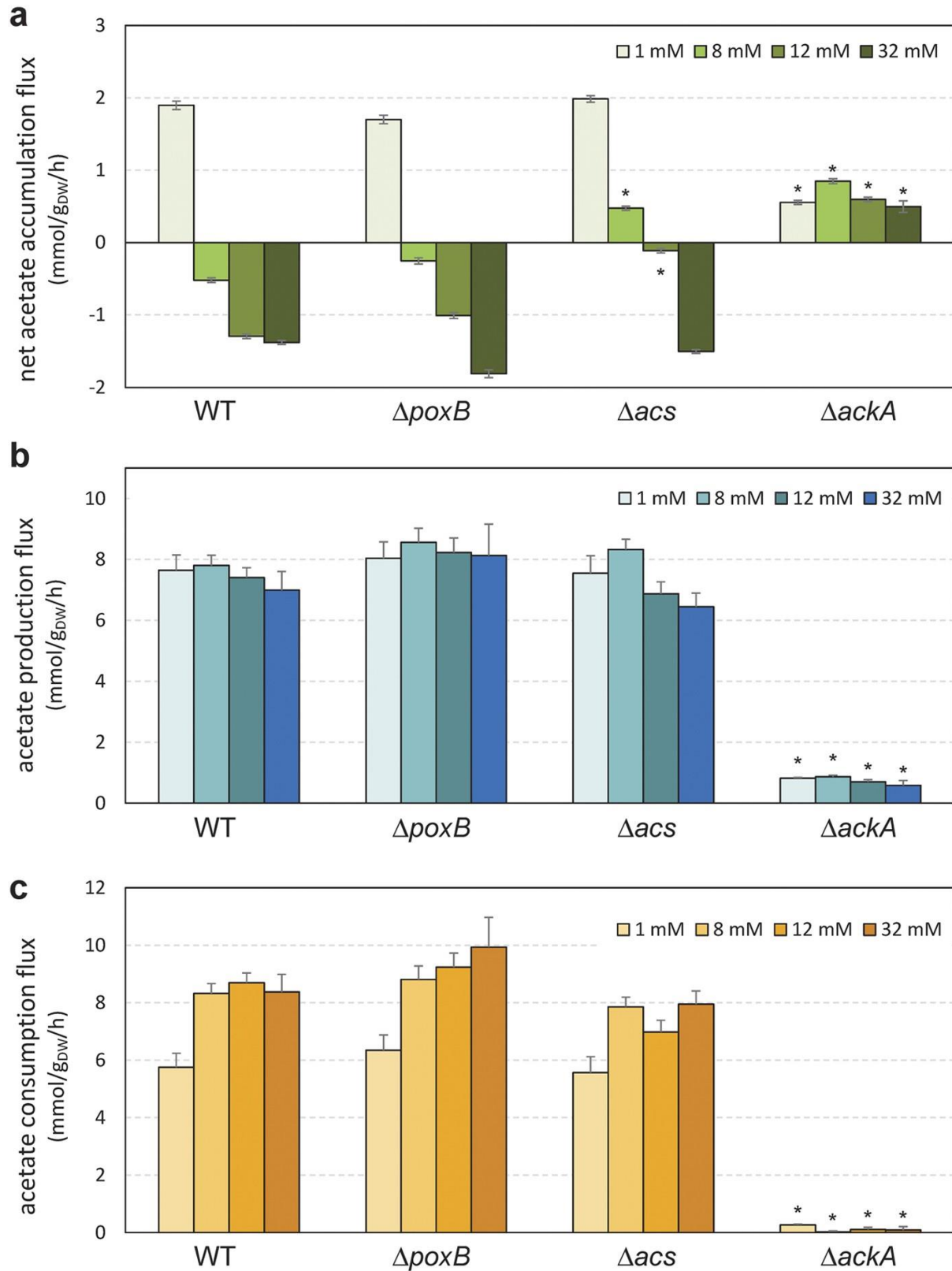


Figure 32 : Net acetate accumulation flux and unidirectional production and consumption fluxes in *E. coli* K-12 MG1655 WT, ΔackA , Δacs and ΔpoxB grown on glucose and different acetate concentrations. Dynamic ^{13}C -metabolic flux analyses were carried out in which cells were grown in a medium containing uniformly ^{13}C -labelled glucose +1, 8, 12 or 32 mM of unlabeled acetate. The fluxes of net acetate accumulation (**a**) and individual acetate production (**b**) and consumption (**c**) were quantified by fitting to experimental data, as detailed in the Methods. Asterisk (*) represents a *p*-value lower than 0.01 when compared to the wild type strain grown in the same condition.

- **The metabolic control of the Pta-AckA pathway ensures a rapid response of *E. coli* to changes in acetate availability**

An intuitive advantage of the proposed regulatory mechanism is that it could enable a rapid response of the Pta-AckA flux to changes in acetate availability. To evaluate the timing of this response, *E. coli* was grown on glucose, and in mid-exponential phase acetate was added to the culture to suddenly increase the acetate concentration from 3 to 30 mM. Changes in glucose and acetate concentrations were monitored every minute after the acetate pulse for 8 minutes and compared to a control experiment where no acetate was added (**Figure 33**). The glucose consumption rate was reduced after the acetate pulse (**Figure 33 A**) which is consistent with the results obtained in steady-state conditions (**Figure 31 B**). Remarkably, while the acetate concentration increased in the control experiment, it decreased in the one or two minutes after the acetate pulse (**Figure 33 B**). Therefore, the addition of acetate provoked a rapid reversal of the net acetate flux from accumulation towards utilization. This fast response confirms the actual control of the Pta-AckA pathway *in vivo* by extracellular acetate levels and is consistent with the thermodynamic control of this pathway.

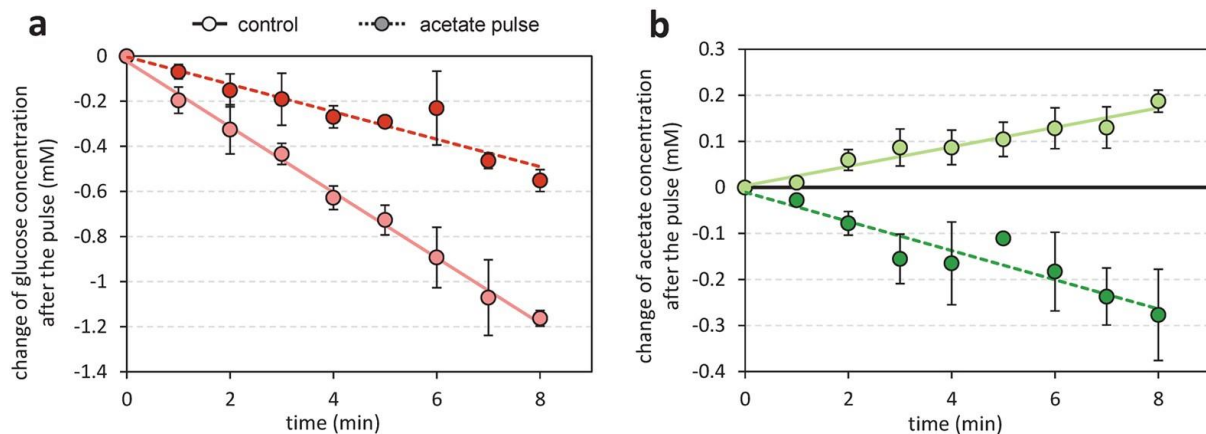


Figure 33 : Short-term response of the *Pta-AckA* flux to an acetate pulse. *E. coli* was grown on M9 supplemented with 15 mM glucose. Changes in concentration of glucose (a) and acetate (b) were measured in mid-exponential growth phase with (dark green line) or without (control experiment, light green line) addition of acetate (at a final concentration of 30 mM) in mid-exponential growth phase.

- **Acetate is not only a by-product of glycolytic carbon sources but is also their potential co-substrate**

We showed that glucose and acetate can be co-substrates for *E. coli* provided the latter compound is present in sufficiently high concentrations in the medium. We investigated whether this could also be the case for other glycolytic carbon sources, notably for some nutrients assumed to support growth of *E. coli* in the human gut. This was tested by growing *E. coli* on gluconate and fucose with or without addition of 32 mM acetate in the medium. As observed on glucose, acetate was produced from gluconate or fucose as sole carbon sources. When 32 mM acetate was added to the medium, acetate was utilized simultaneously with the glycolytic substrates (**Figure 34**). These observations extend the findings made on glucose and indicate that acetate is not only a by-product of glycolytic nutrients but can also be their co-substrate, depending solely on its extracellular concentration.

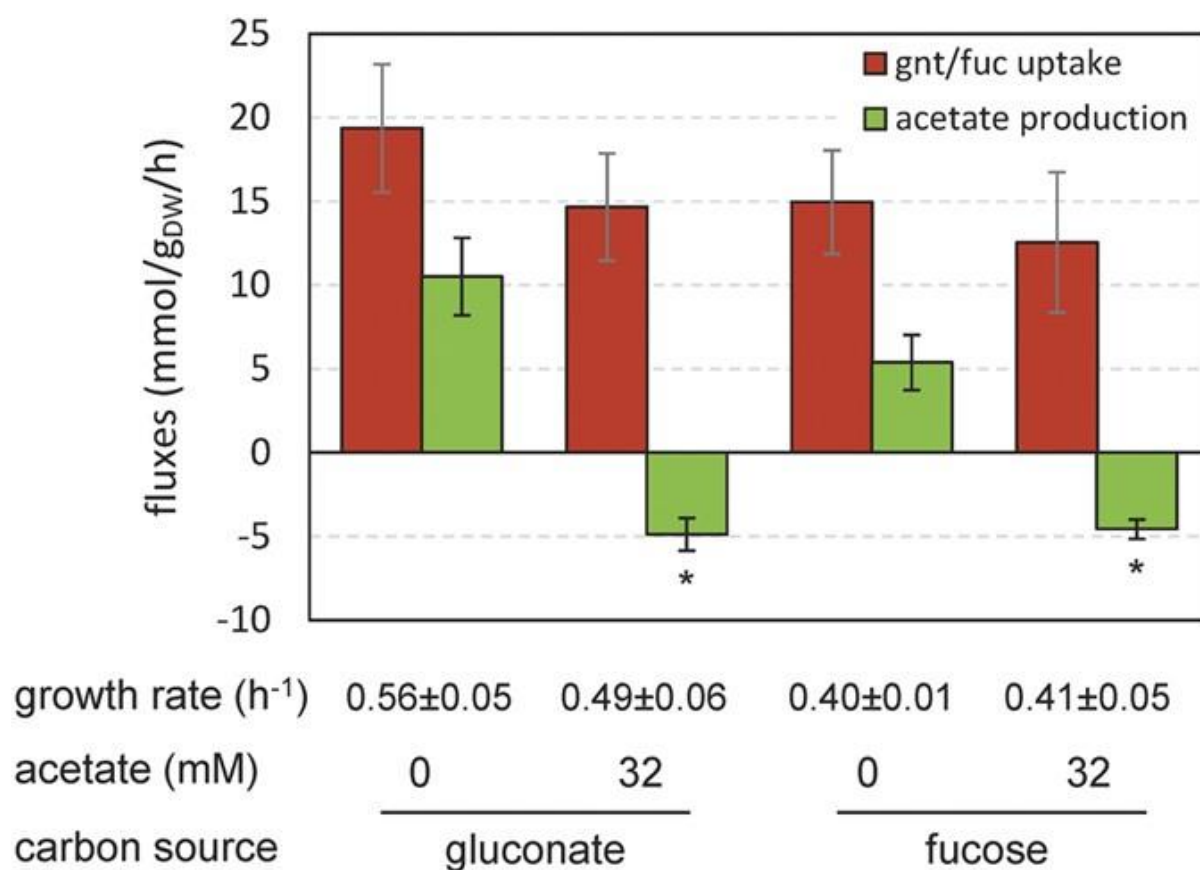


Figure 34 : *E. coli* can co-consume acetate and glycolytic carbon sources. *E. coli* was grown on M9 supplemented with 15 mM gluconate or fucose. Growth rates, glycolytic substrate uptake rates and acetate accumulation rates were measured with or without acetate added initially to the medium (at a concentration of 32 mM). Asterisk (*) represents a *p*-value lower than 0.01 when compared to the same condition without acetate added initially to the medium.

Discussion

The data reported in this work show that *E. coli* can consume both acetate and glucose simultaneously upon exponential growth on excess glucose, in contrast to what is usually considered for this organism. This acetate consumption is not supported by acetyl-CoA synthetase. Not only is this enzyme repressed by catabolite repression in these conditions, but the simultaneous consumption of glucose and acetate is observed – to the same extent and even at very high acetate concentrations – in a mutant deleted for the *acs* gene. The potential contribution of PoxB to this phenomenon can also be eliminated. This acetate utilization is supported by the Pta-AckA pathway. Though known to be reversible, the latter pathway is considered to be involved only in acetate production. Our data show that the Pta-AckA pathway alone can support both the production and consumption of acetate upon excess glucose. Indeed, the pathway allows two opposite processes to occur concomitantly, including the conversion of acetyl-CoA into acetate and the reverse conversion of acetate into acetyl-CoA. The two unidirectional fluxes were measured and were significant. They were in the range of glucose uptake, and were 3–4 times higher than the net flux of acetate production or utilization. The overall result (acetate production or consumption) is the net balance between the two opposite processes. The net direction of the Pta-AckA pathway upon excess glucose, i.e. net production or net utilization of acetate, is controlled thermodynamically and is basically determined by the extracellular concentration of the compound. The experimental data and the kinetic model of the Pta-AckA pathway presented in this work are consistent and indicate that

acetate is produced when its external concentration is below a threshold value of 8 mM. Above this threshold value, acetate is consumed.

The two main pathways of acetate metabolism in *E. coli*, i.e. the Pta-AckA and Acs pathways, appear to have very different mechanisms of control. Acs is controlled by catabolite repression, which is an active regulation process. This repression prevents the operation of the Pta-AckA-Acs cycle and hence avoids the spillage of energy. The Pta-AckA pathway is controlled thermodynamically – i.e. a passive process – which can have various benefits. First, the unidirectional fluxes of acetate production and acetate utilization are instantaneously adapted to the external concentration of acetate. This allows fine tuning of acetate metabolism according to its availability. Moreover, this regulatory mechanism allows metabolism to switch rapidly from acetate dissimilation to acetate assimilation during glycolytic growth, for instance in response to a sudden increase in acetate availability. Indeed, as shown by the acetate pulse experiments, the thermodynamic response time of the Pta-AckA pathway is of the order of 2 minutes, which is much faster than the time needed to functionally express new enzymes by hierarchical regulation (i.e. Acs). This ability to react fast is likely beneficial to face sudden changes in acetate concentration and might represent a competitive advantage in particular environments or conditions. This illustrates that metabolism is not self-contained in terms of control, but is highly sensitive to the environment. Finally, acetate assimilation via Acs can be seen as an effective but expensive way – due to the operation of the Pta-AckA-Acs cycle – to assimilate acetate in low or limited carbon environments whereas the Pta-AckA pathway is a low cost process to scavenge acetate in C-rich environments.

Acetyl-phosphate, the intermediate of the Pta-AckA pathway, is known to regulate many cellular processes in *E. coli* by phosphorylating or acetylating proteins

and other molecules (Kuhn *et al.* 2014, Weinert *et al.* 2013, Wolfe 2005). It is tempting to speculate that, due to the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway, the intracellular level of acetyl-phosphate, hence its regulatory role, is modulated according to acetate availability. Indeed, our kinetic model predicts the accumulation of acetyl-phosphate when the extracellular concentration of acetate increases. The intracellular concentration in acetyl-phosphate is predicted to be 6 μ M at 0.1 mM of acetate in the medium, and it increases to 3 mM at 60 mM acetate. These predicted concentrations are in good agreement with the intracellular levels of acetyl-phosphate reported in the literature (Klein *et al.* 2007, McCleary and Stock 1994, Pruss and Wolfe 1994, Weinert *et al.* 2013). The amplitude of the variation in acetyl-phosphate concentrations due to the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway, as given by the model, is about 3 orders of magnitude. This is significant and consistent with the role of acetyl-phosphate as regulator, in particular in increasing the acetylation level of proteins *in vivo* (Weinert *et al.* 2013). Hence, the extracellular concentration of acetate might modulate the acetyl-phosphate pool through the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. This, in turn, would regulate many cellular processes, and likely result in fine tuning of metabolism according to acetate availability.

Our data indicate that acetate metabolism in *E. coli* is controlled to a large extent by the environment through the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway. This control allows the bacterium to consume acetate even in conditions of glucose excess, provided the external concentration in acetate is high enough. This contrasts with the general consideration that acetate can be consumed only after exhaustion of glycolytic carbon sources. Our results indicate that the mode of utilization of glycolytic substrates and acetate by *E. coli* can be either sequential or concomitant depending on acetate availability. The net production of acetate by

glucose-utilizing cells is abolished when the external concentration of acetate is 8 mM. Neither glucose uptake nor cell growth are altered in this condition, indicating that (net) acetate production is not an absolute requirement for *E. coli* to grow on glucose, be it to conserve energy (el-Mansi and Holms 1989), or to control toxic organic acid pools (Warnecke and Gill 2005). In the laboratory, growth of *E. coli* on glucose is typically carried out in conditions resulting in low accumulation of acetate. In such conditions, the thermodynamics of the Pta-AckA pathway favors acetate production. The net production of acetate upon (exponential) growth on glucose can be the result of the thermodynamic driving force in the Pta-AckA pathway that drives acetate metabolism towards acetate production. In contrast to laboratory conditions, acetate concentration in the intestine is high (between 30 and 100 mM) (Argenzio *et al.* 1974, Cummings and Englyst 1987, Macfarlane *et al.* 1992), well above the 8 mM threshold. From the thermodynamic point of view, such levels of acetate favor the net consumption of this compound in the intestine. It is therefore very likely that *E. coli* co-consumes acetate together with sugars in the intestine, in contrast to what is currently assumed (Fabich *et al.* 2008).

Methods

- **Bacterial strains**

Escherichia coli K-12 MG1655 was selected as the model wild-type strain. BW25113 mutants (Baba *et al.* 2006) were used to create their equivalent in the MG1655 background by bacteriophage P1-mediated transduction. Constructions were validated by PCR using internal, external and kanamycin-related primers ([Supplementary Table S1](#)). The list of strains is given in [Supplementary Table S2](#).

- **Cultures**

E. coli was grown in M9 mineral medium complemented with 15 mM glucose (Nicolas *et al.* 2007). Sodium acetate (prepared in solution at pH 7) was added to reach the required concentration. Acetate labelling assay was performed by adding 1.4 mM fully ^{13}C -labeled acetate during mid-exponential phase or 2.4 mM one hour after glucose exhaustion. For ^{13}C -labeling experiments designed for flux calculation, unlabeled glucose was replaced by uniformly ^{13}C -labeled glucose (Eurisotop, France). Cultures were performed in duplicate or triplicate in shake-flasks at 37 °C and 200 rpm, in a volume of 200 mL. Growth was monitored by optical density at 600 nm using a Genesys 6 spectrophotometer (Thermo, USA), and a correlation factor of 0.37 g_{DW}/L/OD unit was used to calculate biomass concentration.

- **Extracellular metabolome analysis**

Concentrations of labeled and unlabeled glucose and acetate were quantified in filtered broth (0.2 µm, Sartorius, Germany) by 1D ^1H -NMR on a Bruker Ascend

800 MHz spectrometer equipped with a 5 mm QCI cryoprobe (Bruker, Germany), as detailed previously (Enjalbert *et al.* 2013).

- **Intracellular metabolome analysis**

Intracellular metabolites were extracted from cells exponentially-growing on glucose (without acetate initially present in the medium) using the differential sampling method. Adenine nucleotides (ATP and ADP) were measured by LC-MS and quantified using the Isotope Dilution Mass Spectrometry approach (Millard *et al.* 2014). Absolute intracellular concentrations of ADP and ATP were calculated assuming a cytosolic volume of 1.77×10^{-3} L/g_{DW} (Chassagnole *et al.* 2002).

For isotopic analyses, samples (500 µL) of culture broth were collected in 3 mL of quenching solution (20% H₂O/40% methanol/40% acetonitrile) maintained at -20 °C (Rabinowitz and Kimball 2007). Cellular extracts were dried, suspended in 200 µL water, and analyzed by mass spectrometry as described previously (Kiefer *et al.* 2007). The ¹³C contents of intracellular metabolites were quantified from their isotopic patterns after correction for naturally abundant isotopes using the IsoCor software (Millard *et al.* 2012). Statistical differences in labeling incorporation between the glucose consumption phase and the acetate consumption phase were calculated using Student's paired t-tests with two tailed distributions.

- **Dynamic ¹³C-metabolic flux analysis**

To quantify acetate production and consumption fluxes, a dynamic model describing the propagation of ¹³C-atoms through the metabolic network was developed. This model includes seven reactions that represent glucose uptake, glycolysis, acetate production and consumption, and growth. Note that the system

boundary considered here is the shake flask and not the cell. Therefore, cells accumulate at rate $X(t) \cdot \mu$ (where $X(t)$ denotes the concentration of biomass at time t and μ denotes the growth rate), glucose is consumed at rate $X(t) \cdot q_S$ (where q_S is the specific glucose uptake rate), and acetate accumulates at rate $X(t) \cdot (v_3 - v_4)$ (where v_3 and v_4 are the specific acetate production and consumption rates, respectively). The dynamics of seven variables (concentrations of biomass and of labeled and unlabeled glucose, acetate and AcCoA) were simulated using the following system of ordinary differential equations (ODEs):

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dGlc_0}{dt} = -q_S \cdot \overline{Glc_0} \cdot X \quad (2)$$

$$\frac{dGlc_1}{dt} = -q_S \cdot \overline{Glc_1} \cdot X \quad (3)$$

$$\frac{dAce_0}{dt} = v_3 \cdot \overline{AcCoA_0} \cdot X - v_4 \cdot \overline{Ace_0} \cdot X \quad (4)$$

$$\frac{dAce_1}{dt} = v_3 \cdot \overline{AcCoA_1} \cdot X - v_4 \cdot \overline{Ace_1} \cdot X \quad (5)$$

$$\frac{dAcCoA_0}{dt} = 2 \cdot v_1 \cdot \overline{Glc_0} \cdot X + v_4 \cdot \overline{Ace_0} \cdot X - (v_3 + v_2) \cdot \overline{AcCoA_0} \cdot X + \mu \cdot AcCoA_0 \quad (6)$$

$$\frac{dAcCoA_1}{dt} = 2 \cdot v_1 \cdot \overline{Glc_1} \cdot X + v_4 \cdot \overline{Ace_1} \cdot X - (v_3 + v_2) \cdot \overline{AcCoA_1} \cdot X + \mu \cdot AcCoA_1 \quad (7)$$

where the subscript 0 represents the unlabeled metabolite and 1 represents the ^{13}C -metabolite. $\overline{Glc_0}$, $\overline{Glc_1}$, $\overline{Ace_0}$, $\overline{Ace_1}$, $\overline{AcCoA_0}$, and $\overline{AcCoA_1}$ represent the abundances of the corresponding isotopic species relative to the total metabolite pool.

The system of ODEs defined by Eqs 1–7 was implemented in FORTRAN, and simulations were performed using the *lsoda* function of the *deSolve* package of R (v2.15, www.r-project.org), as detailed previously (Millard et al. 2015).

parameters (fluxes: μ , qS , $v3$, $v4$; and initial concentrations: Glc_0 , Glc_1 , Ace_0 , Ace_1) were estimated using the *nlsic* algorithm developed by (Sokol *et al.* 2012), by fitting the time-course concentrations of biomass, labeled glucose, and labeled and unlabeled acetate. Sensitivity analyses were carried out using the Monte-Carlo method (with 1,000 iterations). The relative standard deviations on the estimated parameters were below 10%. The scripts used to perform ^{13}C -flux calculations are distributed in [Supplementary Information](#) under an open source license to ensure reproducibility and reusability.

Statistical differences in fluxes between the wild-type and mutant strains were calculated using Student's paired t-tests with two tailed distributions.

- **In silico analyses of the Pta-AckA pathway**

Gibbs energy of the Pta-AckA pathway ($\Delta G_{Pta-AckA}$) was calculated for a wide range of acetate levels (10 μM to 100 mM) using the following equation:

$$\Delta G_{Pta-AckA} = \Delta G_{Pta-AckA}^0 + R \cdot T \cdot \ln \Pi \quad (8)$$

with

$$\Pi = \frac{ATP \cdot CoA \cdot Ace}{AcCoA \cdot ADP \cdot P} \quad (9)$$

and

$$\Delta G_{Pta-AckA}^0 = -R \cdot T \cdot \ln \left(K_{eq}^{Pta} \cdot K_{eq}^{AckA} \right) \quad (10)$$

where R is the universal gas constant ($R = 8.3143 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T is the temperature ($T = 310 \text{ K}$), Π is the mass action ratio (calculated from reactant concentrations, eq. 9), and K_{eq} is the equilibrium constant of the reaction ($K_{eq}^{AckA} = 174$ and $K_{eq}^{Pta} = 0.0281$) (Kadir *et al.* 2010). Reactant concentrations were fixed at the

values measured in this study ($\text{ATP} = 2.4 \pm 0.5 \text{ mM}$, $\text{ADP} = 0.61 \pm 0.18 \text{ mM}$) or elsewhere ($\text{P} = 10 \text{ mM}$; $\text{CoA} = 1.22 \text{ mM}$; $\text{AcCoA} = 0.61 \text{ mM}$) (Amin and Peterkofsky 1995).

To investigate the impact of changes of acetate concentration on the flux through the Pta-AckA pathway, a kinetic model of this pathway was constructed. Rate laws and parameter values were taken from the literature (Kadir *et al.* 2010), and concentrations of phosphate, CoA, acetylCoA, ADP and ATP were set to their experimental values. The robustness of these simulations to parameter uncertainties was evaluated using a Monte-Carlo analysis (with 20,000 iterations), where all the concentrations and parameters were uniformly sampled within $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$ and $\pm 40\%$ of their experimental value. The R scripts used to perform these simulations and generate the figures are provided in [Supplementary Information](#).

Abdel-Hamid, A. M., M. M. Attwood and J. R. Guest (2001). "Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*." Microbiology (Reading) **147**(Pt 6): 1483-1498.

Amin, N. and A. Peterkofsky (1995). "A dual mechanism for regulating cAMP levels in *Escherichia coli*." J Biol Chem **270**(20): 11803-11805.

Argenzio, R. A., M. Southworth and C. E. Stevens (1974). "Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract." Am J Physiol **226**(5): 1043-1050.

Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.

Castano-Cerezo, S., V. Bernal, T. Rohrig, S. Termeer and M. Canovas (2015). "Regulation of acetate metabolism in *Escherichia coli* BL21 by protein N(epsilon)-lysine acetylation." Appl Microbiol Biotechnol **99**(8): 3533-3545.

Castano-Cerezo, S., J. M. Pastor, S. Renilla, V. Bernal, J. L. Iborra and M. Canovas (2009). "An insight into the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*." Microb Cell Fact **8**: 54.

Chang, Y. Y., A. Y. Wang and J. E. Cronan, Jr. (1994). "Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the rpoS(katF) gene." Mol Microbiol **11**(6): 1019-1028.

Chassagnole, C., N. Noisommit-Rizzi, J. W. Schmid, K. Mauch and M. Reuss (2002). "Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*." Biotechnol Bioeng **79**(1): 53-73.

Chong, H., J. Yeow, I. Wang, H. Song and R. Jiang (2013). "Improving acetate tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP)." PLoS One **8**(10): e77422.

Cummings, J. H. and H. N. Englyst (1987). "Fermentation in the human large intestine and the available substrates." Am J Clin Nutr **45**(5 Suppl): 1243-1255.

el-Mansi, E. M. and W. H. Holms (1989). "Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures." J Gen Microbiol **135**(11): 2875-2883.

Enjalbert, B., F. Letisse and J. C. Portais (2013). "Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in *Escherichia coli*." Metabolites **3**(3): 820-837.

Enjalbert, B., P. Millard, M. Dinclaux, J. C. Portais and F. Letisse (2017). "Acetate fluxes in *Escherichia coli* are determined by the thermodynamic control of the Pta-AckA pathway." Sci Rep **7**: 42135.

Fabich, A. J., S. A. Jones, F. Z. Chowdhury, A. Cernosek, A. Anderson, D. Smalley, J. W. McHargue, G. A. Hightower, J. T. Smith, S. M. Autieri, M. P. Leatham, J. J. Lins, R. L. Allen, D. C. Laux, P. S. Cohen and T. Conway (2008). "Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine." Infect Immun **76**(3): 1143-1152.

Flores, N., S. Flores, A. Escalante, R. de Anda, L. Leal, R. Malpica, D. Georgellis, G. Gosset and F. Bolivar (2005). "Adaptation for fast growth on glucose by differential expression of central carbon metabolism and gal regulon genes in an *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system." Metab Eng **7**(2): 70-87.

Harden, A. (1901). "LXIV.—The chemical action of *Bacillus coli communis* and similar organisms on carbohydrates and allied compounds." J. Chem. Soc., Trans. **79**(0): 610-628.

Jian, J., S. Q. Zhang, Z. Y. Shi, W. Wang, G. Q. Chen and Q. Wu (2010). "Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways." Appl Microbiol Biotechnol **87**(6): 2247-2256.

Kadir, T. A. A., A. A. Mannan, A. M. Kierzek, J. McFadden and K. J. M. c. f. Shimizu (2010). "Modeling and simulation of the main metabolism in *Escherichia coli* and its several single-gene knockout mutants with experimental verification." **9**(1): 1-21.

Kakuda, H., K. Hosono, K. Shiroishi and S. Ichihara (1994). "Identification and characterization of the *ackA* (acetate kinase A)-*pta* (phosphotransacetylase) operon and complementation analysis of acetate utilization by an *ackA-pta* deletion mutant of *Escherichia coli*." J Biochem **116**(4): 916-922.

Kiefer, P., C. Nicolas, F. Letisse and J. C. Portais (2007). "Determination of carbon labeling distribution of intracellular metabolites from single fragment ions by ion chromatography tandem mass spectrometry." Anal Biochem **360**(2): 182-188.

Klein, A. H., A. Shulla, S. A. Reimann, D. H. Keating and A. J. Wolfe (2007). "The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators." J Bacteriol **189**(15): 5574-5581.

Kotte, O., B. Volkmer, J. L. Radzikowski and M. Heinemann (2014). "Phenotypic bistability in *Escherichia coli*'s central carbon metabolism." Mol Syst Biol **10**(7): 736.

Kuhn, M. L., B. Zemaitaitis, L. I. Hu, A. Sahu, D. Sorensen, G. Minasov, B. P. Lima, M. Scholle, M. Mrksich, W. F. Anderson, B. W. Gibson, B. Schilling and A. J. Wolfe (2014). "Structural, kinetic and proteomic characterization of acetyl phosphate-dependent bacterial protein acetylation." PLoS One **9**(4): e94816.

Kumari, S., C. M. Beatty, D. F. Browning, S. J. Busby, E. J. Simel, G. Hovel-Miner and A. J. Wolfe (2000). "Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **182**(15): 4173-4179.

Kumari, S., R. Tishel, M. Eisenbach and A. J. Wolfe (1995). "Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **177**(10): 2878-2886.

Luli, G. W. and W. R. Strohl (1990). "Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations." Appl Environ Microbiol **56**(4): 1004-1011.

Macfarlane, G. T., G. R. Gibson and J. H. Cummings (1992). "Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon." J Appl Bacteriol **72**(1): 57-64.

McCleary, W. R. and J. B. Stock (1994). "Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators." J Biol Chem **269**(50): 31567-31572.

Millard, P., F. Letisse, S. Sokol and J. C. Portais (2012). "IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments." Bioinformatics **28**(9): 1294-1296.

Millard, P., S. Massou, C. Wittmann, J. C. Portais and F. Letisse (2014). "Sampling of intracellular metabolites for stationary and non-stationary (13)C metabolic flux analysis in *Escherichia coli*." Anal Biochem **465**: 38-49.

Millard, P., J. C. Portais and P. Mendes (2015). "Impact of kinetic isotope effects in isotopic studies of metabolic systems." BMC Syst Biol **9**: 64.

Nicolas, C., P. Kiefer, F. Letisse, J. Kromer, S. Massou, P. Soucaille, C. Wittmann, N. D. Lindley and J. C. Portais (2007). "Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase." *FEBS Lett* **581**(20): 3771-3776.

Novère, N. L., M. Hucka, H. Mi, S. Moodie, F. Schreiber, A. Sorokin, E. Demir, K. Wegner, M. I. Aladjem, S. M. Wimalaratne, F. T. Bergman, R. Gauges, P. Ghazal, H. Kawaji, L. Li, Y. Matsuoka, A. Villéger, S. E. Boyd, L. Calzone, M. Courtot, U. Dogrusoz, T. C. Freeman, A. Funahashi, S. Ghosh, A. Jouraku, S. Kim, F. Kolpakov, A. Luna, S. Sahle, E. Schmidt, S. Watterson, G. Wu, I. Goryanin, D. B. Kell, C. Sander, H. Sauro, J. L. Snoep, K. Kohn and H. Kitano (2009). "The Systems Biology Graphical Notation." *Nature Biotechnology* **27**: 735.

O'beirne, D. and G. J. B. E. Hamer (2000). "Oxygen availability and the growth of *Escherichia coli* W3110: a problem exacerbated by scale-up." **23**(5): 487-494.

Orth, J. D., T. M. Conrad, J. Na, J. A. Lerman, H. Nam, A. M. Feist and B. O. Palsson (2011). "A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism--2011." *Mol Syst Biol* **7**: 535.

Phue, J. N., S. J. Lee, J. B. Kaufman, A. Negrete and J. Shiloach (2010). "Acetate accumulation through alternative metabolic pathways in *ackA* (-) *pta* (-) *poxB* (-) triple mutant in *E. coli* B (BL21)." *Biotechnol Lett* **32**(12): 1897-1903.

Pruss, B. M. and A. J. Wolfe (1994). "Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **12**(6): 973-984.

Rabinowitz, J. D. and E. Kimball (2007). "Acidic acetonitrile for cellular metabolome extraction from *Escherichia coli*." *Anal Chem* **79**(16): 6167-6173.

Renilla, S., V. Bernal, T. Fuhrer, S. Castano-Cerezo, J. M. Pastor, J. L. Iborra, U. Sauer and M. Canovas (2012). "Acetate scavenging activity in *Escherichia coli*: interplay of acetyl-CoA synthetase and the PEP-glyoxylate cycle in chemostat cultures." *Appl Microbiol Biotechnol* **93**(5): 2109-2124.

Sokol, S., P. Millard and J. C. Portais (2012). "influx_s: increasing numerical stability and precision for metabolic flux analysis in isotope labelling experiments." *Bioinformatics* **28**(5): 687-693.

Valgepea, K., K. Adamberg, R. Nahku, P. J. Lahtvee, L. Arike and R. Vilu (2010). "Systems biology approach reveals that overflow metabolism of acetate in *Escherichia coli* is triggered by carbon catabolite repression of acetyl-CoA synthetase." *BMC Syst Biol* **4**: 166.

Valgepea, K., K. Adamberg and R. Vilu (2011). "Decrease of energy spilling in *Escherichia coli* continuous cultures with rising specific growth rate and carbon wasting." *BMC Syst Biol* **5**: 106.

Warnecke, T. and R. T. Gill (2005). "Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications." *Microb Cell Fact* **4**(1): 25.

Weinert, B. T., V. Iesmantavicius, S. A. Wagner, C. Scholz, B. Gummesson, P. Beli, T. Nystrom and C. Choudhary (2013). "Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*." *Mol Cell* **51**(2): 265-272.

Wolfe, A. J. (2005). "The acetate switch." *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(1): 12-50.

Xu, B., M. Jahic and S. O. Enfors (1999). "Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*." *Biotechnol Prog* **15**(1): 81-90.

4. Base moléculaire de la robustesse métabolique de la voie des acides aminés branchés

Dans le **chapitre 3**, l'analyse du métabolisme d'*E. coli* à l'échelle cellulaire a permis de mieux comprendre le métabolisme de l'acétate au cours de la phase de croissance sur glucose et de revisiter le modèle métabolique admis jusqu'à présent. Dans ce chapitre, le métabolisme est analysé finement à l'échelle d'une voie métabolique. Au-delà de l'acétate, l'analyse approfondie des spectres RMN des surnageants de culture d'*E. coli* dans les conditions de culture décrites dans le **chapitre 3**, indique la présence de nombreux métabolites extracellulaires. Parmi ceux-ci, la détection de 2,3-dihydroxy-isovalérate (DHIV) est particulièrement intrigante. En effet, il s'agit d'un intermédiaire de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés (Branched Chain Amino Acids – BCAA) dont l'excrétion n'a jamais été rapportée jusqu'à présent chez *E. coli* mais également chez d'autres microorganismes. L'étude décrite dans ce chapitre, vise donc à comprendre dans un premier temps, l'origine de l'excrétion de DHIV puis l'importance de cette excrétion sur le fonctionnement métabolique de la voie et sur la robustesse de sa régulation pour assurer la biosynthèse des BCAAs. Cette étude combine des analyses quantitatives de métabolites par RMN et par spectrométrie de masse, d'ARN et d'activités spécifiques et des approches de modélisation métabolique. Cette approche intégrative révèle également l'existence d'activité enzymatique promiscuite des acétolactate

synthases (AHAS), jouant un rôle prépondérant dans le fonctionnement de la voie des BCAA.

Ce chapitre est rédigé sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis à une revue généraliste traitant de question de métabolisme.

4.1. *Revisiting the BCAA pathway of E. coli reveals the molecular basis of its robustness and homeostasis*

Mickael Dinclaux, Pierre Millard & Fabien Létisse

TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France.

Unpublished

Abstract

Cellular metabolism involves a complex network of chemical reactions and physical processes. While it is one of best-understood of biochemical networks, unquantified part of biochemical processes occurring within metabolic networks remains still hidden. Enzyme promiscuity and overflow metabolism are such processes, which operate *underground* within and beyond metabolic network. Experimental and computational efforts are made to chart the map of underground metabolism. Its ability to maintain metabolic homeostasis and robustness, however, have not been previously explored. In a canonical example, commonly used *Escherichia coli* strains carry an inactive α -acetoxy acid synthase isoenzyme, which normally contribute to fine-tuning the regulation of biosynthetic fluxes in the branched chain amino acid pathway. However, the unique physiological consequence reported so far is growth inhibition by valine in very specific conditions. Here we identify compensating regulatory mechanisms that enables precise metabolic flux control in the pathway. The mechanisms take place downstream the AHAS-catalyzed step with the excretion of propionate resulting from an AHAS promiscuous activity, and upstream with the excretion of 2,3-dihydroxy-isovalerate and 2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate, the substrates of the dihydroxy-acid dehydratase. We demonstrate that such underground mechanisms cooperate with the classical feedback regulation to allow homeostasis of BCAA biosynthesis and to ensure the metabolic robustness.

Introduction

A major challenge addressed by metabolic regulation in microbial cells is to ensure the metabolic system's robust and efficient operation, adjusting supply and demand metabolic fluxes, in ever-changing nutritional environments. To achieve this, intricate set of regulatory mechanisms involving multiple molecular layers controls both abundance and enzyme activities. For example, in prototrophic bacteria, like *Escherichia coli*, required enzymes for *de novo* biosynthesis of monomers such as amino acids, nucleotides, *etc.*, are produced whether the latter are present or absent in the immediate environment of the cells (Schmidt *et al.* 2016). Since enzymes are generally overabundant in the cell to fulfill biosynthetic demand (Donati *et al.* 2018, Sander *et al.* 2019), fine tuning of the supply/demand balance is achieved by a distributed control on catalytic performances of several enzymes of the biosynthetic pathways (Chubukov *et al.* 2014). End-product homeostasis often have a crucial role in controlling the biosynthetic pathway activities. It is well illustrated with amino acids in *E. coli*, that act on their own biosynthesis both at the transcriptional (Zaslaver *et al.* 2004) and at the metabolic levels by allosteric feedback inhibition of the first committed enzyme of amino acid biosynthesis (Reznik *et al.* 2017, Sander *et al.* 2019). Such regulatory strategy enables precise metabolic flux control through the biosynthetic pathway and end-product homeostasis in a wasteless manner (Reznik *et al.* 2017), in contrast to directed overflow regulatory mechanism for example where end-products homeostasis is ensured by metabolic intermediate excretion (Reaves *et al.* 2013).

Negative feedback regulation on the committed step is a regulatory architecture shared by 16 out the 20 amino acids biosynthetic pathways in *E. coli* (Reznik *et al.*

2017). Among them, branched-chain amino acids (BCAA) biosynthetic pathway has however, a rather odd metabolic situation. Same set of enzymes are used for valine and isoleucine biosynthesis to the exception of the threonine deaminase (TDA), which catalyzed the committed step of isoleucine biosynthesis (Liu *et al.* 2017) (**Figure 35**). Both amino acids exert negative feedback regulation on the committed enzyme of their own biosynthesis, with isoleucine acting on TDA, and valine on the α -acetoxy acid synthase (AHAS). Because AHAS is also used for isoleucine biosynthesis, feedback inhibition exerted by valine may compromise the precise metabolic flux control to fulfill the isoleucine biosynthetic demand. This regulatory problem is solved by the use of multiple AHAS isoenzymes, each of which has distinct biochemical properties and regulatory mechanisms (Gollop *et al.* 1983, Liu *et al.* 2017, Vyazmensky *et al.* 2009). In *E. coli*, three pairs of co-transcribed genes, *ilvBN*, *ilvGM*, and *ilvIH*, respectively encode AHAS isoenzymes. Of the three isoenzymes, AHASII is the most suited for isoleucine biosynthesis since the expression of the *ilvGM* genes is controlled by transcriptional attenuation mediated by L-isoleucine (Lawther and Hatfield 1980), the affinity to 2-ketobutyrate yielded by TDA, is much higher than to pyruvate (Barak *et al.* 1987) and, isoleucine and valine do not exert feedback inhibition on its activity (Lawther *et al.* 1981, Yang *et al.* 2005). Combined with negative feedback regulation on TDA, independent control on isoleucine biosynthesis is thus made feasible and robust to any environmental changes in BCAA availability.

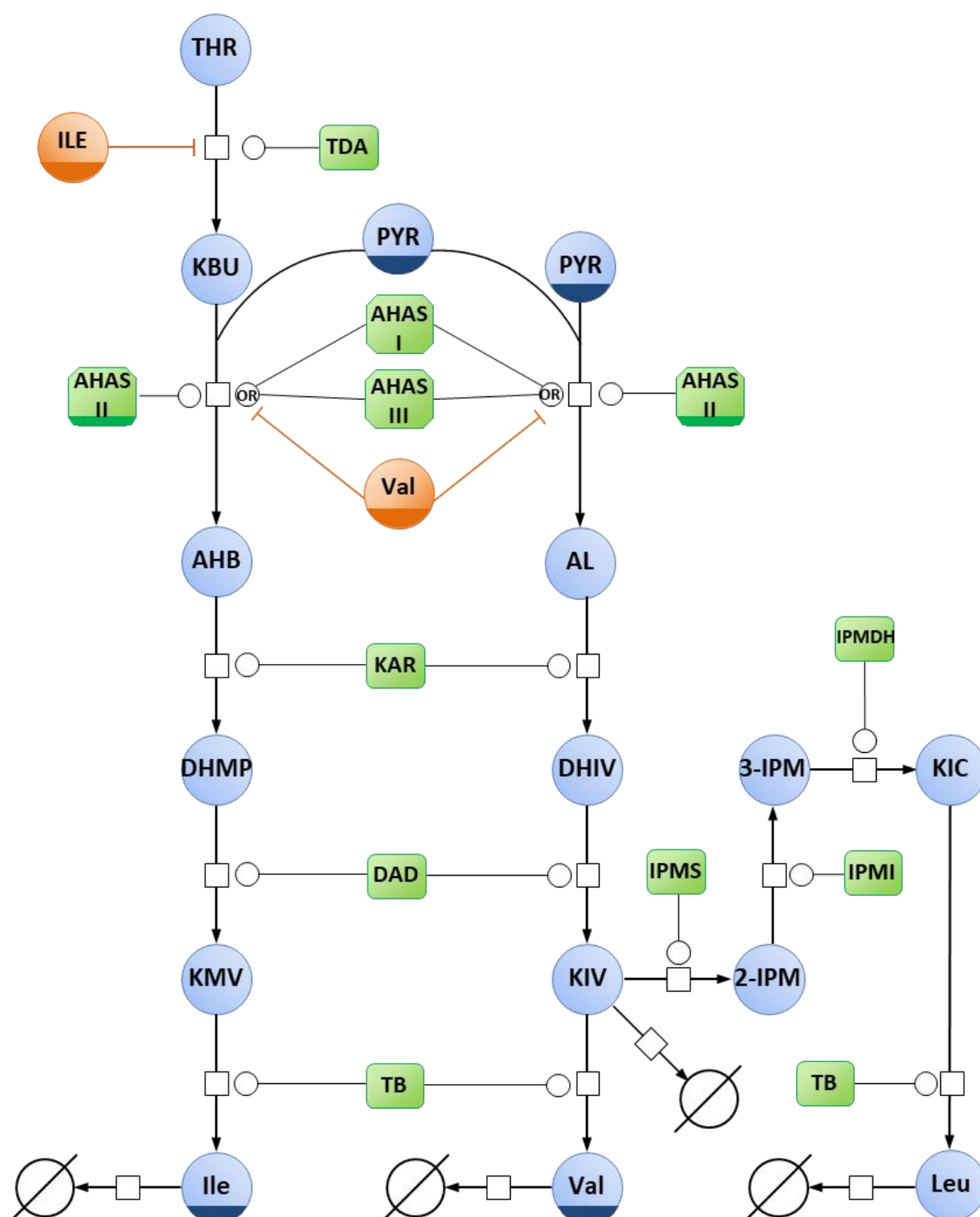


Figure 35 : The BCAA pathway. Abbreviations of enzymes: The threonine deaminase (TDA)(EC 4.3.1.19), the acetohydroxy acid synthase (AHAS)(EC 4.1.3.18), the ketol-acid reductoisomerase (KARI)(EC 1.1.1.86), the dihydroxy-acid dehydratase (DAD)(EC 4.2.1.9), the transaminase B (TB)(EC 2.6.1.42), and the 2-isopropylmalate synthase (IPMS) (EC 4.1.3.12), l'isopropylmalate isomerase (IPMI)(EC 4.2.1.33), et la 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH)(EC 1.1.1.85). Abbreviations of metabolites : L-threonine (THR), L-isoleucine (Ile), L-valine (Val), L-leucine (Leu), pyruvate (PYR), 2-ketobutyrate (KBU), acetolactate (AL), 2-aceto-2-hydroxybutanoate (AHB), 2,3-dihydroxy-isovalerate (DHIV), 2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate (DHMP), 2-keto-isovalerate (KIV), 2-keto-methylvalerate (KMV), 2-isopropylmalate (2-IPM), le 3-isopropylmalate (3-IPM), and 2-ketoisocaproate (KIC).

The regulatory system in *E. coli* K-12 strains (MG1655, W3110, and MC4100 strains) is structurally altered since a frameshift mutation in *ilvG* gene leads to an inactive AHASII (Lawther *et al.* 1982). Because both AHASI and III are feedback inhibited by valine, the absence of a functional AHASII should compromise flux control for valine and isoleucine. However, the unique related-phenotype reported so far is the complete growth inhibition when valine is present in the medium and not isoleucine, presumably through feedback inhibition of AHASI and AHASIII (De Felice *et al.* 1979). As evidenced by the number of studies carried out with those strains and their use as platform organism for biotechnological purposes (Baba *et al.* 2006, Chen *et al.* 2013, Park *et al.* 2007), the regulatory mechanisms in place seem to ensure efficiently and robustly the valine and isoleucine demand in a vast majority of cases.

Results and discussions

In our hand, the growth rate in glucose-minimal medium of the *E. coli* K-12 MG1655 *ilvG*⁺ strain (corrected for the frameshift mutation in the *ilvG* gene) is indeed very similar to that of the *E. coli* K-12 MG1655 WT ($0.56 \pm 0.05 \text{ h}^{-1}$ versus $0.54 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ respectively). In the same line, we observe no competitive growth advantage of the WT strain versus the *ilvG*⁺ strain (

Table S1), confirming that compensatory mechanisms are efficient to support *E. coli*'s growth in prototrophic conditions.

To bring them to light, we first performed a comparative ¹H NMR analysis of culture medium collected in mid-exponential growth phase. Interestingly, we identified unambiguously the presence of propionate, 2,3-dihydroxy-isovalerate (DHIV) and 2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate (DHMP) only in the culture medium of the WT strain (**Figure 36, Figure S1, Figure S2**). Propionate is reported in *E. coli*, to be mainly the

end-product of threonine degradation (Hesslinger *et al.* 1998)) although it can also be an intermediate in other metabolic pathways whose physiological role remains quite vague (Brock *et al.* 2002, Haller *et al.* 2000, Simanshu *et al.* 2007).

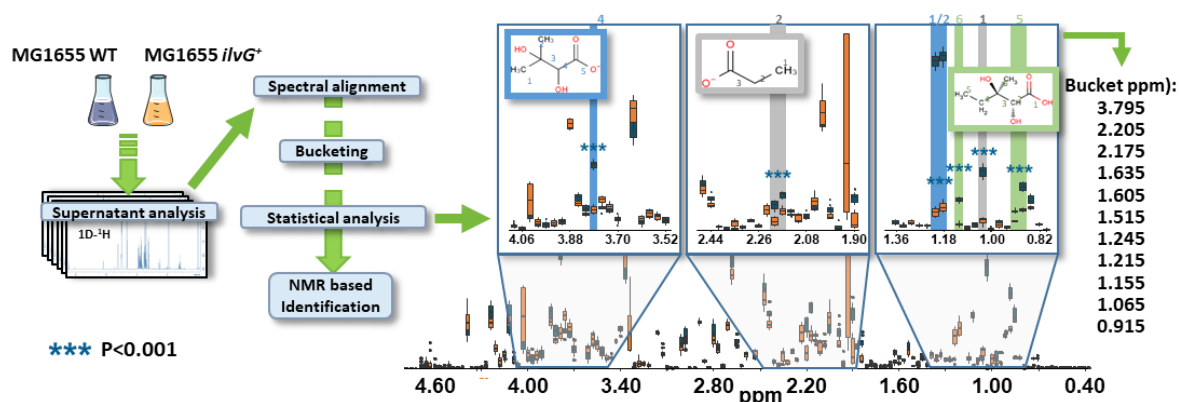


Figure 36 : Workflow for metabolites identification based on NMR spectrum

In threonine degradation pathway, propionate derives from 2-ketobutyrate that is converted first into propionyl-CoA by a reaction catalyzed by a pyruvate- or ketobutyrate-formate-lyase and then by the sequential operation of the phosphate phosphoryltransferase and the propionate kinase, similarly to acetate formation from acetyl-CoA. DHIV and DHMP are intermediates of the BCAA pathway being both the substrate of the dihydroxy-acid dehydratase (DAD) encoded by *ilvD*, according to (Sawers 1998) whether they originate from pyruvate or 2-ketobutyrate. The close metabolic proximity of those metabolites suggests that compensatory mechanisms operate locally to fulfill the biosynthetic fluxes in BCAA pathway (**Figure 37**).

177

Metabolites excretion in the cultivation medium, designated as overflow metabolism (Reaves *et al.* 2013), is traditionally interpreted as a consequence of an intracellular accumulation of metabolic intermediates resulting from an overflow in metabolic pathway fluxes. As we observed DHIV and DHMP accumulation in the cultivation medium, this suggests that the DAD would be somehow rate-limiting in *E. coli* WT strain. This was confirmed by overexpressing *ilvD* gene in *E. coli* WT strain since it abolishes the extracellular accumulation of DHIV and DHMP (**Figure 38 A**) while propionate is still excreted (data not show). The overflow flux represents about 12,3 % (**Figure S3**) of the metabolic flux upstream of the DAD-catalyzed reaction. The fact that the DAD may not be able to absorb this modest - albeit significant - excess of flux is intriguing since it is frequently observed in various metabolic pathways that the actual flux is well below the flux capacity of the metabolic pathway (Christodoulou *et al.* 2018, Volke *et al.* 2019). Indeed, we found that the amount of active DAD present in the WT strain is 5 fold lower compared to the *ilvG*⁺ strain (**Figure 38 B**). In contrast, we did not observe significant difference in the expression of *ilvD* and more widely, of all the genes of the *ilvGMEDA* operon (**Figure 38 C**) meaning that the presence of a non-coding sequence of several hundred base pairs at the terminus of the *ilvG* reduces the translation efficiency of *ilvD* in the WT strain. In agreement, the growth rate of $\Delta ilvG$ strain in minimal medium supplemented with glucose is similar to that of the WT strain and DHIV and DHMP excretion is strongly reduced. The amount of active dihydroxyacid dehydratase is 10 fold higher than in the WT strain while the level of *ilvD* expression is only slightly higher (**Figure 38 B**).

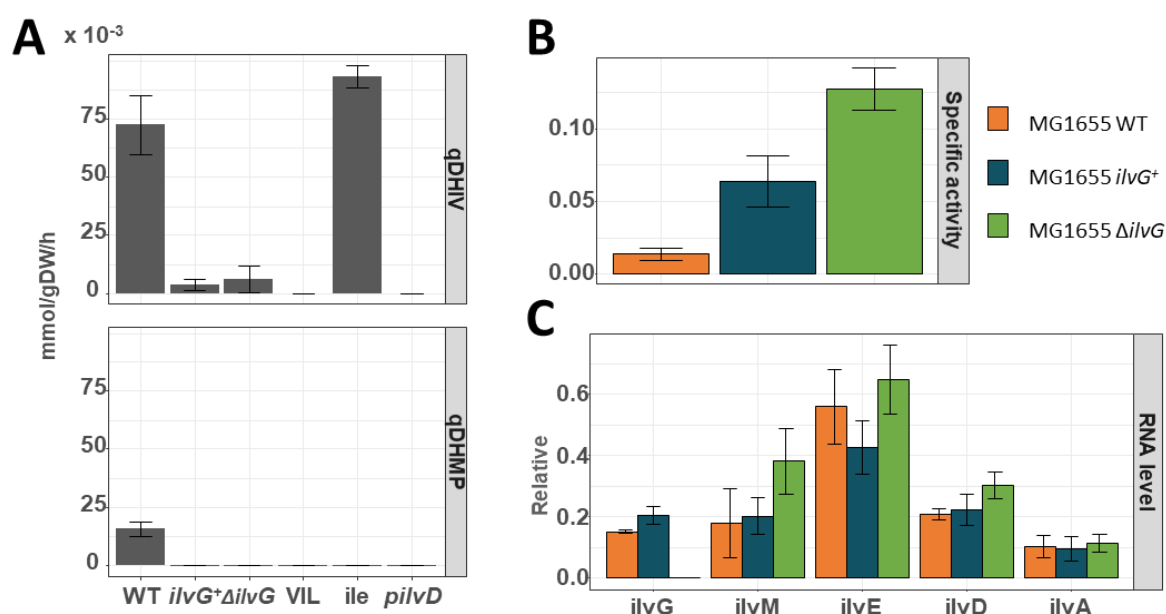


Figure 38 : Elucidation of the production of DHIV and DHMP in *E. coli*. A: Net flux production of DHMP and DHIV with or without AHAS II and by overproduction of DAD enzyme. B: Specific activity of the DAD (mmol/g/min). C: RT-qPCR of the *ilvGMEDA* operon (normalized with the *ihfB* gene (Enjalbert et al. 2013)).

With regard to propionate, we first make sure that highly oxygen-sensitive enzymes, pyruvate-formate-lyase or by 2-ketobutyrate-formate lyase (Rasmussen et al. 1991, Sawers 2001), were not involved in propionate excretion. Single KO mutants of encoding genes, *pflB* and *tdcE* respectively, still accumulate propionate in the culture medium, meaning that another unknown route for converting 2-ketobutyrate into propionate indeed operates in *E. coli* WT strain in aerobic condition. Given that the only other known enzyme to utilize 2-ketobutyrate in *E. coli* is AHAS, we examined whether this enzyme could synthesize propionate from 2-ketobutyrate.

AHAS operates in an ordered “ping-pong” mechanism (Chipman et al. 1998, Liu et al. 2016) in which pyruvate binds first to the enzyme (as a donor) to be decarboxylated in a nearly irreversible fashion. Then alternative second substrate (as an acceptor), 2-ketobutyrate or pyruvate, competes for the 2-hydroxyethyl-ThDP (HEThDP) intermediate to form 2-aceto-2-hydroxy-butyrate or 2-acetolactate

respectively (Gollop *et al.* 1989, Liu *et al.* 2016). Importantly, AHAS is also known to catalyze side reactions proceeding from HET_hDP intermediate among which one may mention the oxygenase side reaction forming acetate in an oxygen consuming reaction (Abell and Schloss 1991). Furthermore, condensation of two 2-ketobutyrate is reported to be *in vitro* feasible by AHAS I and II (Gollop *et al.* 1989, Steinmetz *et al.* 2010). Therefore, it might make sense to designate AHAS as candidate for the formation of propionate from 2-ketobutyrate in a mechanism where 2-ketobutyrate would be first decarboxylated into propionate and released by oxygenase side reaction before its condensation with another pyruvate or 2-ketobutyrate. To test for this hypothesis, we first assessed *in vitro* the activity of purified reconstituted AHAS by measuring with NMR over the time, the formation of products from pyruvate. As expected, we detected acetolactate, and significant amount of acetate. Surprisingly, we also detected acetoin (**Figure 39 A**) which appears to be stoichiometrically formed from acetolactate, indicating that its synthesis is AHAS-catalyzed process from acetolactate likely in a similar way as the transformation of pyruvate into acetate as given in the (**Figure 39 B**). We can also note a higher *in-vitro* production with AHAS I.

As previously reported, we found that AHAS I and II exhibited a significant activity with 2-ketobutyrate condensing two molecules to form 2-ethyl-2-hydroxy-3-oxopentanoate in contrast to AHASIII (**Table S3**). More importantly, we also detected the presence of propionate with AHASI and II in the reaction mixture meaning that they are able to catalyze *in vitro*, the synthesis of propionate from 2-ketobutyrate, likely in an oxygenase side reaction as described previously for the formation of acetate from pyruvate (Abell and Schloss 1991).

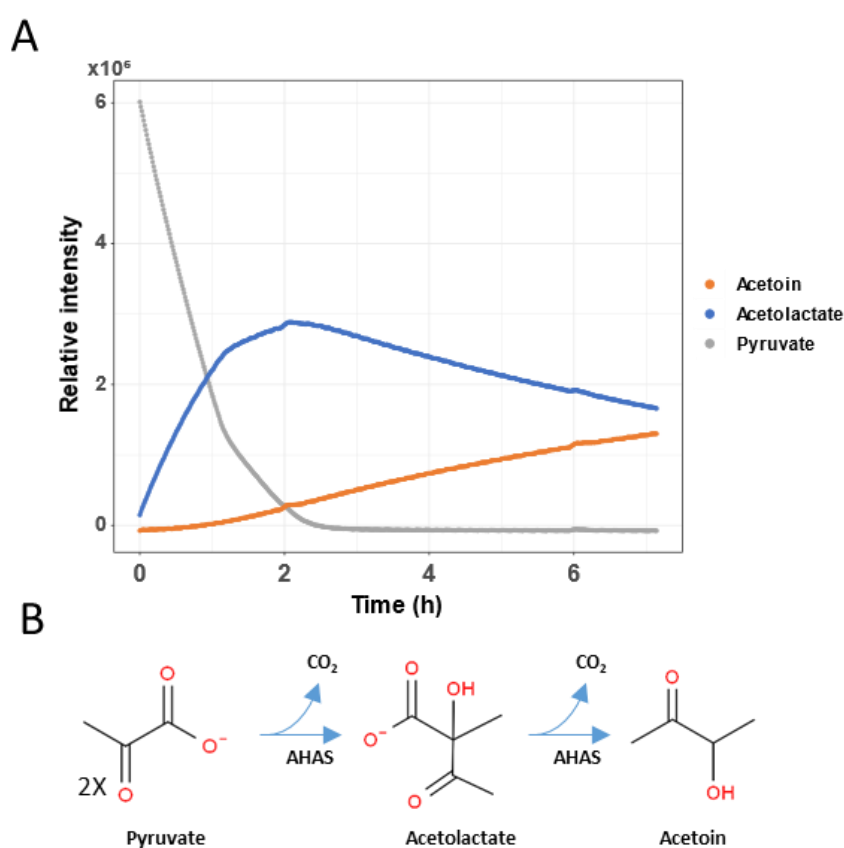


Figure 39 : In-vitro analyses of AHAS in the presence of pyruvate. A: NMR kinetics (noesyphpr) of pyruvate consumption and production of acetolactate and acetoin. B: Mechanism of transformation of pyruvate into acetoin

To assess for *in vivo* synthesis of propionate from 2-ketobutyrate by AHAS, we knocked out the genes encoding the large catalytic subunits of AHAS I and III, respectively *ilvB* or *ilvI*, in the *E. coli* K-12 strain. Consequently, the homeostatic

capacity in the BCAA pathway relies only on a unique AHAS (AHASIII in *E. coli* $\Delta ilvB$ and AHASI in *E. coli* $\Delta ilvI$). None of these mutations had a significant effect on the growth rate of *E. coli* (**Table S2**). In line with *in vitro* results, the propionate formation is boosted in the $\Delta ilvI$ mutant since the propionate production flux is 515% higher than that measured in the *E. coli* WT strain and strongly reduced in the $\Delta ilvB$ mutant (**Table S2**).

Therefore, propionate overflow resulting from *promiscuous* reaction catalyzed by AHASI could act as a “metabolic valve” to properly adjust the intracellular 2-ketobutyrate *versus* pyruvate concentration. Indeed, the 2-ketobutyrate /pyruvate ratio is much higher in the $\Delta ilvI$ strain compared to the other strains, consistently with stronger propionate overflow. Interestingly, when we grew the WT and *ilvG*⁺ strains on the glucose-minimal medium supplemented with 2-ketobutyrate (**Figure 40**), we observe a severe growth defect when the strains are exposed to over 0.63 mM 2-ketobutyrate. This phenomenon has already been reported but claiming a presumable toxic effect of KBU on metabolism (Daniel *et al.* 1983, LaRossa *et al.* 1987). However, supplementation with VIL (valine, leucine and isoleucine) relieved the growth defect (**Figure 40**) and the growth of *ilvG*⁺ strain was fully rescued by the sole addition of valine. Because the presence of 2-ketobutyrate in the extracellular medium increases very likely the intracellular pool of 2-ketobutyrate, the intracellular 2-ketobutyrate/pyruvate ratio is shift in favor of 2-ketobutyrate compromising the flux of valine biosynthesis. This is confirmed substituting the valine by pyruvate in the cultivation medium (**Figure 40**) since both the growth of the *ilvG*⁺ and the WT strains are rescued despite the exposure to up to 25mM of 2-ketobutyrate. Finally, these results demonstrate that propionate formation and excretion contribute to fine-tuning

the 2-ketobutyrate/pyruvate ratio and thereby ensure the precise flux distribution in the BCAA pathway.

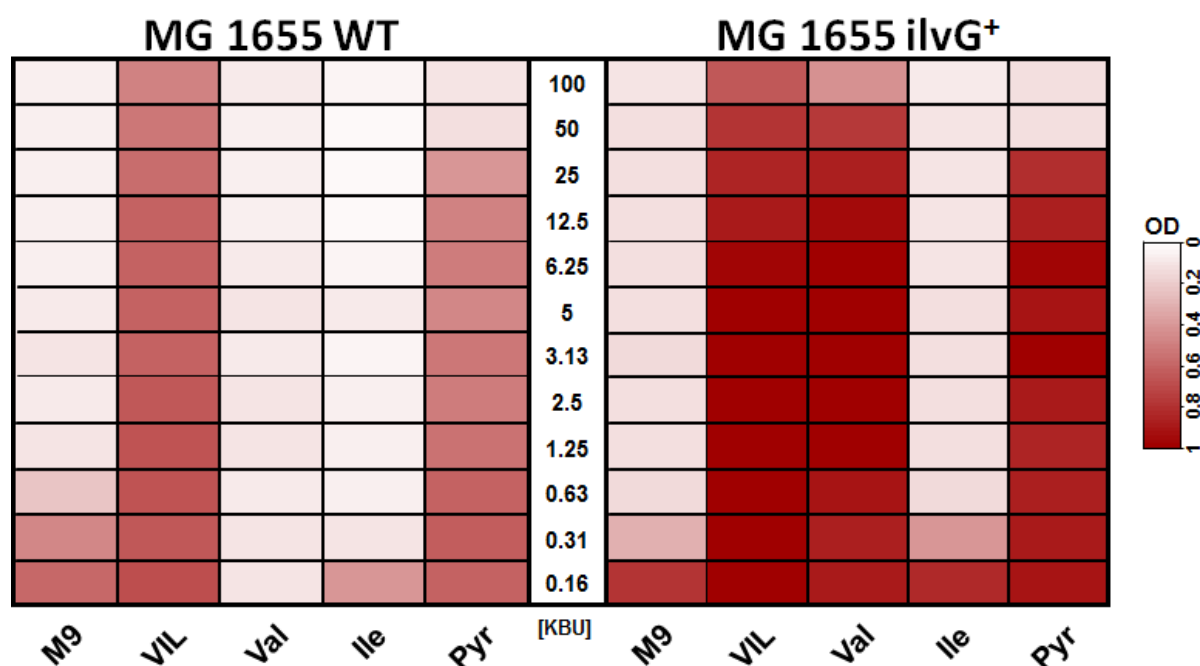


Figure 40 : Delta of optical density (OD) between the addition of KBU and end of growth of the control condition (without addition) on M9 medium supplemented or not with valine, isoleucine, VIL or pyruvate.

An important question that remains open is the role of the newly identified processes in the functioning of the BCAA pathway. We thus investigated how they could affect the performance of BCAA pathway in terms of adaptation and robustness. We also tested if canonical feedback inhibition, which is already known to participate in metabolite homeostasis by adjusting BCAA biosynthesis to demand for growth, could play a role in the emergence of these properties. As it is extremely difficult to assess experimentally the impact of enzymatic promiscuous activity and overflow metabolism, we addressed this question computationally. Eight variant models of the BCAA pathway were constructed to probe all the possible combination of the tested features, i.e. the canonical network topology with or without promiscuous propionate

formation patched to its excretion and/or overflow processes and/or feedback inhibition. Since the exact values of kinetic parameters are unknown, we constructed an ensemble of models with 10,000 sets of parameters (K_M and K_i values randomly sampled from 10 μ M to 10 mM), and each set was also analyzed for a broad range of biologically-relevant enzyme expression levels (10,000 sets of V_{max} randomly sampled from 10 μ mol/gDW/h to 10 mmol/gDW/h). After having validated the model with the experimental data (**Figure S4**), we compared the robustness and adaptive capabilities of each model variant by defining quantitative metrics: robustness was quantified as the proportion of models able to reach a steady-state, and adaptive capabilities was quantified as the proportion of (steady-state) models that are able to maintain a steady-state in response to a 2-fold increase of substrates (threonine and pyruvate) concentrations **Table S4**.

For the canonical BCAA network without feedback inhibition, a proportion of steady-states was reached for only 7% of simulations **Table S4**. Implementation of overflow metabolism or feedback inhibition does not appear to bring any significant advantage (13%), in contrast to enzyme promiscuity, which strongly improves the robustness of the system (27%). Surprisingly, while feedback inhibition is important for metabolite homeostasis, this mechanism does not play a significant role in the pathway robustness (14%). Adding overflow and feedback to promiscuity results in a minor improvement of the robustness (33%), highlighting the importance of the promiscuous AHAS activity for robustness.

In terms of adaptation, 67% of the models could adapt to substrates perturbation in absence of promiscuous activities, overflow reactions and feedback inhibition. This proportion increases to 75-78% in presence of one of the tested features, to 79-81% in presence of two features, and reaches 83% when all features

were included. Adding any of the feature significantly reduces the negative skewness of the distribution, which also points to an improvement of adaptive capabilities of the BCAA pathway. Hence, in contrast to robustness results where promiscuity was identified as the key feature, here each feature appears to bring a similar advantage to the adaptive capabilities of the pathway, and individual advantages are cumulative when combining different features.

Thus, overflow metabolism and promiscuous enzymatic activities cause an underground metabolism, which strongly contributes to the robustness of BCAA pathway functioning. In concert with the canonical feedback inhibition, they participate to regulate homeostasis of metabolic pathways compensating efficiently for genetically altered regulatory structures and diverting excess flux.

Materials and methods

- **Growth media**

Two media was used for the experiences: Luria-Bertani medium (10 g/L of tryptone, 5 g/L of yeast extract and 10 g/L of NaCl) and M9 minimal medium supplemented with glucose (Na₂HPO₄ 17.4 g/L ; KH₂PO₄ 3.03 g/L ; NaCl 0.51 g/L ; NH₄Cl 2.04 g/L ; MgSO₄, 7H₂O 0.49 g/L ; CaCl₂ 4.38 mg/L ; Na₂EDTA, 2H₂O 15.mg/L ; ZnSO₄, 7H₂O 4.5 mg/L ; CoCl₂, 6H₂O 0.3 mg/L ; MnCl₂, 4H₂O 1 mg/L ; H₃BO₃ 1 mg/L ; Na₂MoO₄, 2H₂O 0.4 mg/L ; FeSO₄, 7H₂O 3 mg/L ; CuSO₄, 5H₂O 0.3 mg/L ; Thiamine 50 mg/L ; Glucose 2.7 g/L).

- **Strains constructions**

Strains are listed in **Table S5**. Two mutation techniques were used to obtain the mutated strains. Total depletion of the *ilvG* gene was performed in DY378 strain by homologous recombination (Yu *et al.* 2000). BW25113 mutants (Baba *et al.* 2006) and DY378 strains were used to create their equivalent in the MG1655 background by bacteriophage P1-mediated. Each kanamycin resistance strain was transformed with a pCP20 plasmid to remove the cassette using FLP recombinase.

- **Culture and samples preparation**

Cultures of *E. coli* grown in LB media overnight at 37°C were washed and transferred in minimal M9 based-medium supplemented with glucose in a FLUOstar Optima plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany) at 37°C and 600 rpm (orbital) with a shaking diameter of 1 mm and a duration of 300 s before OD₆₀₀ measurement. The shaking and measurement are repeated 150 times. The

experiments were carried out with standard round 48 or 24-well plates with flat bottoms from Starlab, France (reference CC7682-7548), covered with lids.

Before cells enter the stationary phase, cultivations were performed in triplicate using a bioreactor block in an automatic high throughput fluxomic workstation (Freedom EVO 200, TECAN, Switzerland) (Heux *et al.* 2014). All cultures are inoculated at an initial D600 of 0.1 in minimal M9 based-medium supplemented with glucose (2.7g/L), and the shaking fixed at 2400 rpm.

All long the time, culture was monitored by optical density at 600nm and a correlation factor of 0.37 gDW/L/OD unit was used to calculate biomass concentration. A second robotic platform TECAN Evo 200 is used to fully automatize the final preparation of biological samples for NMR and/or MS analysis. In parallel a part of supernatants was stock on 96-well plates (Sarstedt, reference 82.1582) at -20°C.

- **NMR analysis**

Supernatants samples were used for NRM analysis. 150µl was mix with 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid (TSP-d4) and the solution was introduce on 3mm NMR tubes (Bruker). Analysis was performed on a Bruker Ascend 800 MHz spectrometer equipped with a 5 mm QCI cryoprobe (Bruker, Germany). 1H 1D-NMR at 280K, 128 scans after 4 dummy scans using 30° pulse, a relaxation delay of 2s, was apply for metabolic quantification. Spectral processing and metabolite quantification were performed using Topspin 3.5 (Bruker, Germany). To facilitate interpretation of NMR data, the 1H-NMR spectra were further processed as follows. Each spectra was processed with automatic commands and the integrated signals are normalized on the TSP-d4 signal. Metabolites identification was performed by a combination of HSQC, HMBC, TOCSY and selective 1D-TOCSY acquisitions.

- **Statistical analysis of NMR data**

Statistical analysis of NMR spectra was performed to detect potential metabolic disorders on supernatants samples between different *E. coli*. For each strain, six ¹H-NMR spectra of six replicated at the beginning of the stationary phase were analyzed. By bucketing method with the use of Amix 3.9.15 software, each spectra was divided on rectangular buckets of 0.015 ppm and normalized with the TSP-d4 region. The bucket file was then transform with an R-script and a student test were apply to select significant signals.

- **Metabolic flux analysis**

To quantify extracellular metabolites production and consumption fluxes, a R-script was used (PhysioFit: <https://github.com/MetaSys-LISBP/PhysioFit>) (Peiro *et al.* 2019). Fluxes are estimated from time-course measurements of extracellular metabolites and biomass concentrations in metabolic steady-state. Sensitivity analyses were carried out using the Monte-Carlo method (with 1,000 iterations).

- **SDS-PAGE**

Overexpression of proteins was show by SDS-PAGE. 1ml of culture at OD600 5 was centrifuge at 16100 g during 5 min. The pellet was resuspended on 322.5µL Tris EDTA buffer with 1.5µL of lysozyme at 40U/µL and 0.5µL of Benzonase at 250U/µL. After 20 min at 37°C and shaking, 35µL of the soluble fraction was hydrolyze at 100°C during 5 min with 12.5µL of XT sample buffer (Bio-rad) and 2.5µL of DL-Dithiothreitol 50% (Sigma). Electrophoresis was performed in XT MOPS running buffer

(Bio-rad) with 5µl of hydrolysate on Mini-Protean TGX gels 4-15% (Bio-rad). InstantBlue was used to reveal all the proteins.

- **RT-qPCR analyses**

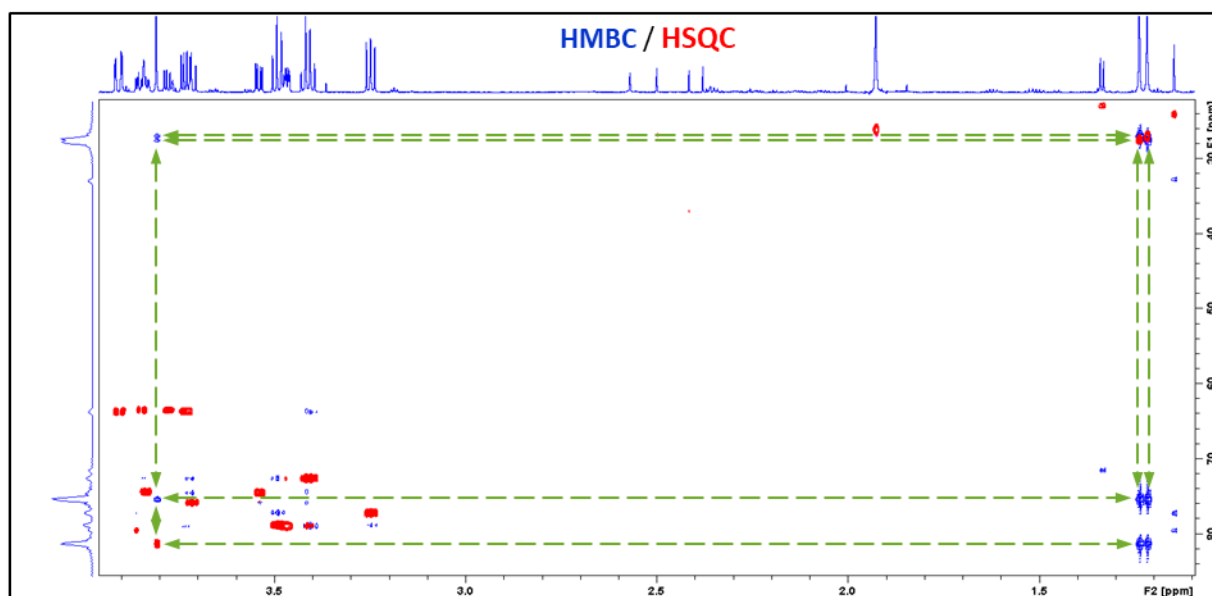
Gene expression was monitored by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) as described in reference (Enjalbert *et al.* 2013). The primers used in this work are listed in **Table S5** and PCR was carried out with an annealing temperature of 60°C.

- **Enzymatic assay**

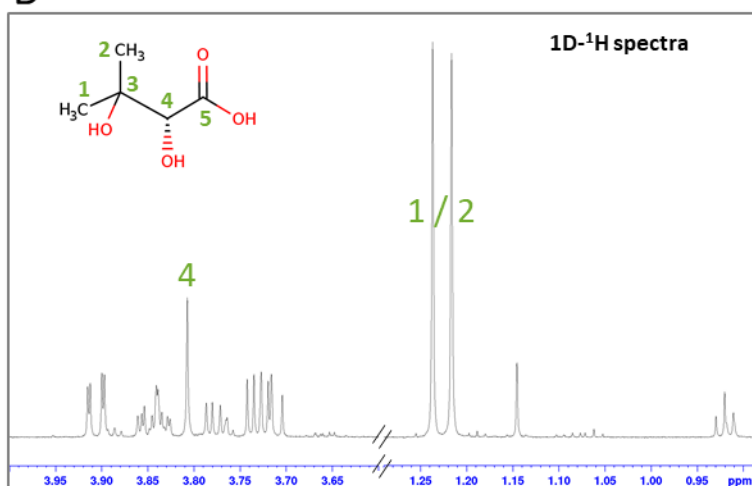
According to an existing protocol, 40ml of cells culture at OD 5 were pelleted and resuspended in a lysis buffer (Letisse 2000) to obtain a final biomass concentration of 20g/L. The cell suspension is then lysed at 0°C using a Fisherbrand™ Q700 Sonicator with 6 breaking cycles from 20 seconds to 30% of maximum power, separated by two minutes of rest for the cooling of the probe and the suspension. After this step, each solution is oxygen-free. The lysate is then used to perform an enzymatic assay in 1ml of Tris buffer pH8 at 12.5mM with MgCl₂ at 8.2mM and 2,3-dihydroxyisovalerate at 10Mm. After 10 min at 37°C, the reaction is stopped by addition of 3 volumes of quenching solution methanol/ Acetonitrile/H₂O (40:40:20) with 6mM of alanine and store at -20°C. The samples are then centrifuged at 19,000 g, dried and resuspended in 1 ml of H₂O solution to be analyzed by NMR.

Supplementary data

A



B

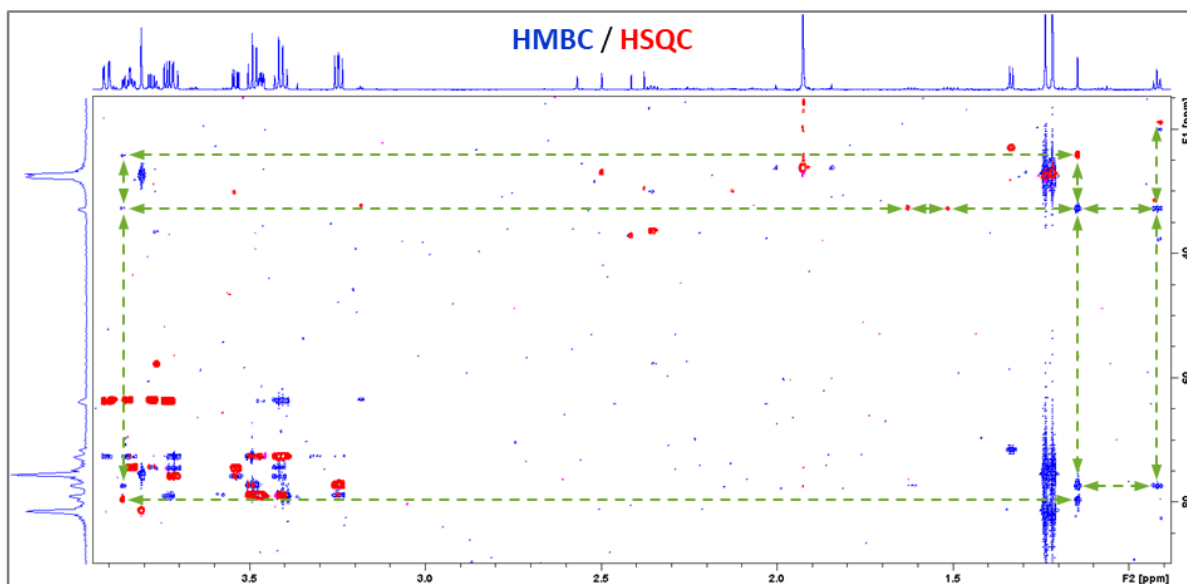


C

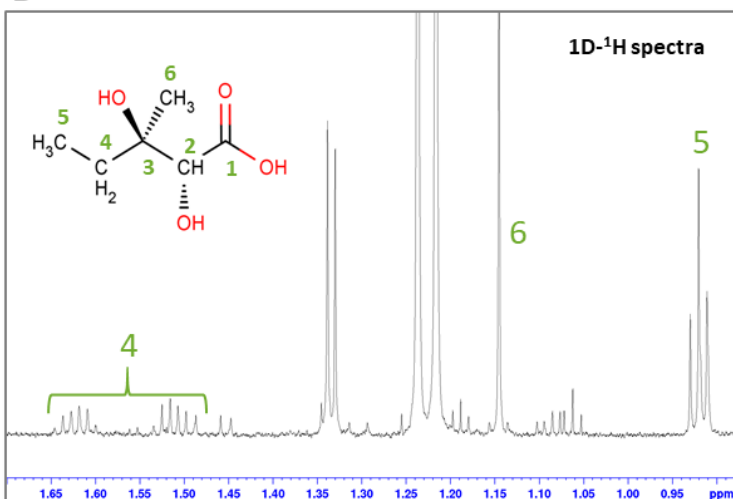
No	C (ppm)	H (ppm)	J (Hz)	Multiplet
1	27,00	1,22		s
2	27,48	1,24		s
3	75,34			
4	81,26	3,81		s
5	181,84			

Figure S1 : DHIV identification. A: superposition of HMBC (blue) and HSQC (red) spectra. B: 1D-¹H spectra for NMR proton identification. C: table of chemical shifts

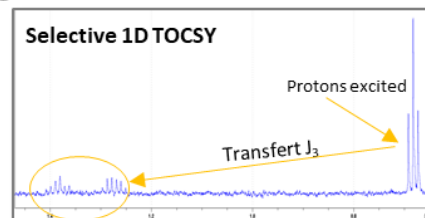
A



B



C



D

No	C (ppm)	H (ppm)	J (Hz)	Multiplet
1	182,33			
2	79,15	3,86		s
3	77,21			
4	32,57	1,63	7,40	m
4		1,51	7,40	m
5	9,69	0,92	7,40	t
6	24,08	1,15		s

Figure S2 : DHMP identification. A: superposition of HMBC (blue) and HSQC (red) spectra. B: 1D-¹H spectra for NMR proton identification. C: Selective 1D TOCSY with proton excitation of carbon 5. D: table of chemical shifts

Table S1 : Growth parameters of *E. coli* MG1655 WT and *ilvG*⁺ strain during aerobic growth on M9 medium. The values were obtained using the Physiofit script with 10 replicates for WT strain and 8 replicates for *ilvG*⁺ strain (Peiro et al. 2019). Flux values (*q*) were calculated in mmol/gDW/h. A *t*-test was used to determine *p*-value.

	MG1655 WT (rep 10)		MG1655 <i>ilvG</i> ⁺ (rep 8)		
	Mean	sd	Mean	sd	p-value
mu	0.56	0.05	0.54	0.03	6.4e-01
qGlucose	-7.97	1.21	-6.84	1.39	3.2e-01
qAcetate	2.94	1.07	2.45	1.31	4.5e-01
qDHIV	0.072	0.013	0.004	0.002	1.6e-08
qDHMP	0.016	0.003	0.000	0.000	2.5e-09
qPropionate	0.022	0.004	0.003	0.002	3.1e-09
Biomass yield	0.034	0.017	0.038	0.020	8.4e-01

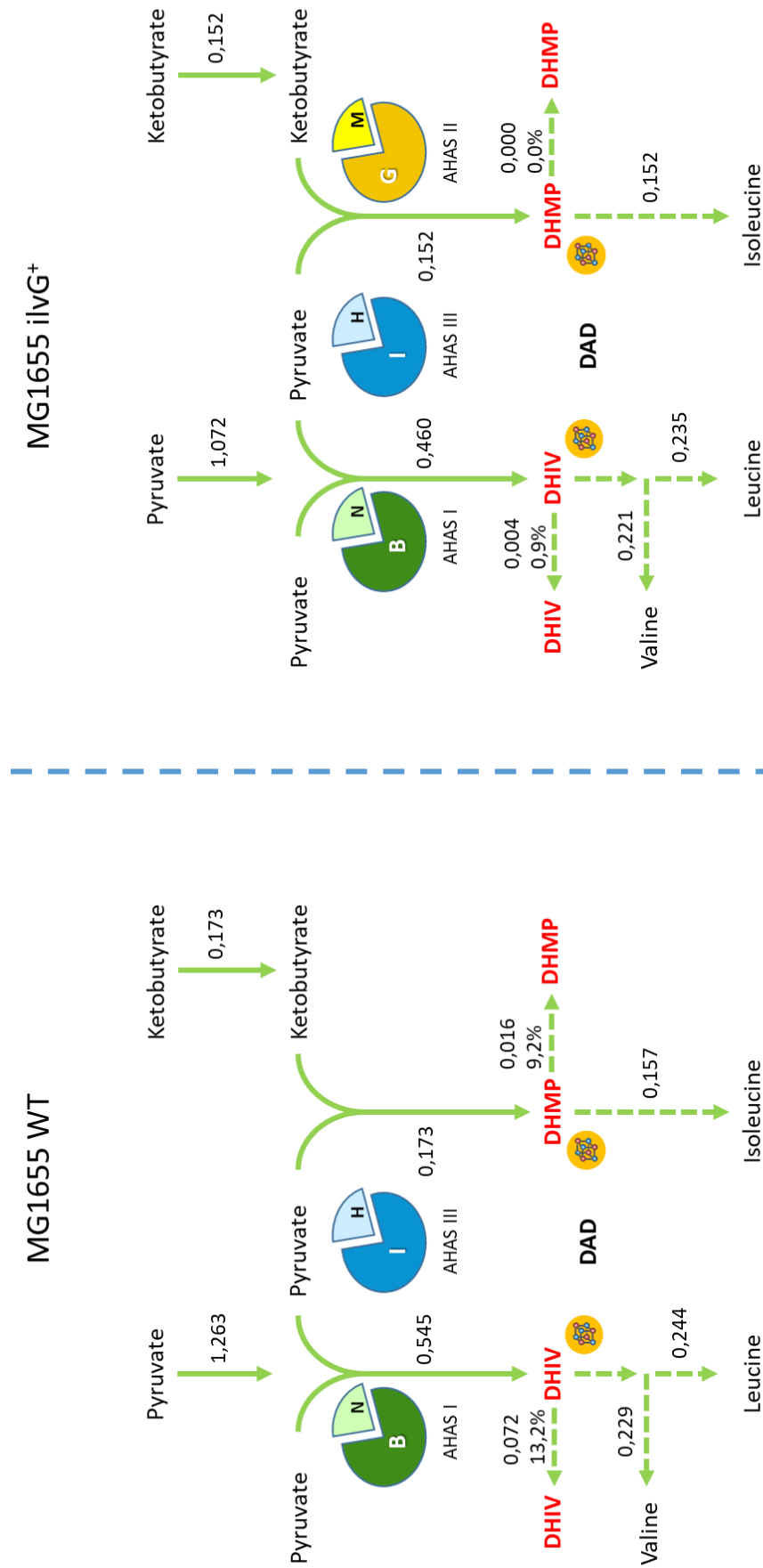


Figure S3 : Flux representation of the BCAA pathway for the MG1655 WT strain and the *ilvG*⁺ strain (mmol.gDW⁻¹.h⁻¹).

Table S2 : Growth parameters of *E. coli* MG1655 WT, *ilvG*⁺ and AHAS mutants strains (*ilvB*, *ilvG*, *ilvI*) during aerobic growth on M9 medium.

	MG1655	WT	<i>ilvG</i> ⁺	$\Delta ilvG$	$\Delta ilvB$	$\Delta ilvI$
Mean	mu	0,56	0,54	0,56	0,49	0,59
	qGlucose	-7,97	-6,84	-7,28	-9,36	-9,24
	qAcetate	2,94	2,45	2,60	5,11	3,92
	qAcetoin	2,07E-03	1,32E-03	2,45E-03	6,01E-04	1,46E-03
	qDHIV	0,072	0,004	0,006	0,004	0,024
	qDHMP	0,016	0,000	0,000	0,000	0,004
	qPropionate	0,022	0,003	0,023	0,008	0,115
	Biomass yield	0,034	0,038	0,031	0,031	0,013
sd	mu	0,05	0,03	0,03	0,01	0,05
	qGlucose	1,21	1,39	1,31	1,51	1,45
	qAcetate	1,07	1,31	0,89	0,83	1,21
	qAcetoin	1,12E-03	1,23E-03	7,30E-04	6,97E-04	1,01E-03
	qDHIV	0,013	0,002	0,006	0,002	0,007
	qDHMP	0,003	0,000	0,000	0,000	0,001
	qPropionate	0,004	0,002	0,004	0,002	0,020
	Biomass yield	0,017	0,020	0,015	0,027	0,009

Table S3: Quantification of products obtained after addition of 40mM of pyruvate or 2-ketobutyrate for each AHAS. EHOP (2-ethyl-2-hydroxy-3-oxopentanoat) a condensation two 2-ketobutyrate

		Acetoin	Propionate	2-Ketobutyrate	Pyruvate	Acetolactate	EHOP	Acetate
Mean	AHAS I	12,55	0,00	0,00	0,00	8,76	0,00	1,15
	2-Ketobutyrate	0,00	1,78	31,47	0,00	0,00	3,81	0,06
	AHAS II	5,12	0,00	0,00	23,17	3,52	0,00	1,24
	2-Ketobutyrate	0,00	0,65	37,64	0,00	0,00	1,19	0,03
	AHAS III	6,05	0,00	0,00	20,42	3,99	0,00	1,21
	2-Ketobutyrate	0,00	0,00	40,24	0,00	0,00	0,07	0,03
sd	AHAS I	0,38	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,06
	2-Ketobutyrate	0,00	0,25	0,69	0,00	0,00	0,20	0,01
	AHAS II	0,43	0,00	0,00	1,14	0,28	0,00	0,08
	2-Ketobutyrate	0,00	0,09	0,48	0,00	0,00	0,21	0,00
	AHAS III	0,75	0,00	0,00	2,31	0,42	0,00	0,10
	2-Ketobutyrate	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,00

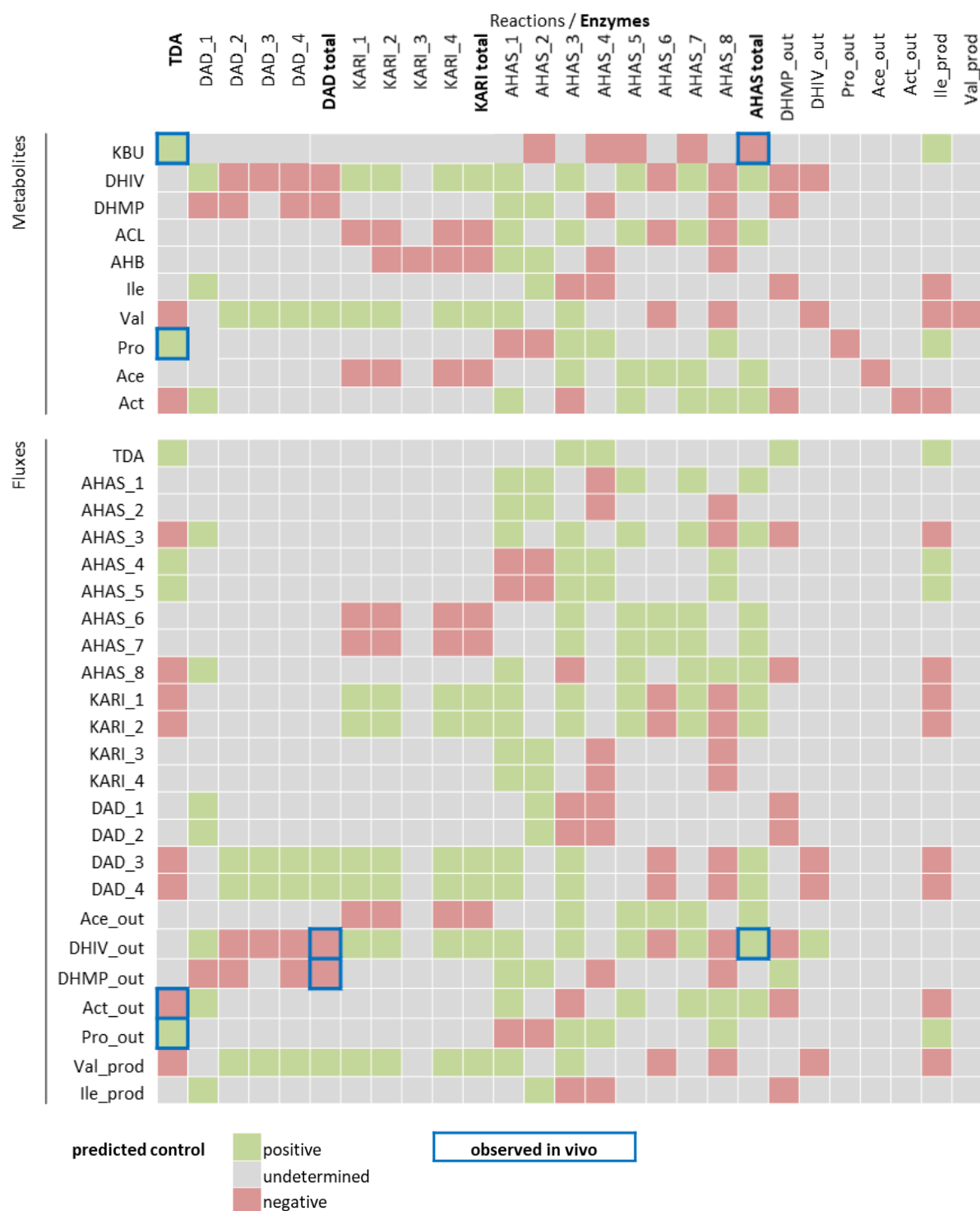


Figure S4 : Metabolic control analysis. Amount of threonine and pyruvate fixed. Green: positive control prediction, Grey: undetermined control prediction, Red: negative control prediction. Blue box represent in-vivo observation

Table S4 : Proportion of models (in %) that reach a steady-state with (+) or without (-) overflow metabolism, feedback inhibition and enzyme promiscuity.

		Enzyme promiscuity			
		+		-	
		Metabolite overflow		Metabolite overflow	
		+	-	+	-
Feedback inhibition	+	42	8	12	8
	-	38	8	10	7

Table S5 : Strains, plasmids and primers used in this article

Strain, plasmid or primer	Description or sequences	Reference or source
Strains		
MG1655	F- λ - <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1	Team collection (Valle <i>et al.</i> 2008)
MG1655 <i>ilvG</i> + <i>fnr</i> -	<i>ilvG</i> fix strain, <i>fnr</i> -	
MG1655 <i>ilvG</i> + <i>fnr</i> +	<i>ilvG</i> fix strain, <i>fnr</i> +	This study
MG1655 Δ <i>ilvG</i> -	<i>ilvG</i> mutant strain, <i>kan</i> ^S	This study
MG1655 Δ <i>ilvG1</i>	<i>ilvG1</i> mutant strain, <i>kan</i> ^S	This study
MG1655 Δ <i>ilvG2</i>	<i>ilvG2</i> mutant strain, <i>kan</i> ^S	This study
BW25113	Keio collection	(Baba <i>et al.</i> 2006)
DY378	W3110 λ cl857 Δ (<i>cro</i> - <i>bio</i>)	(Yu <i>et al.</i> 2000)
Plasmids		
pSE380 Δ NcoI	High-copy-nb. <i>amp</i> ^R	(Angles <i>et al.</i> 2017)
pSE380 Δ NcoI – <i>ilvG</i>	High-copy-nb. Expression vector for the <i>ilvG</i> gene; <i>amp</i> ^R	This study
pSE380 Δ NcoI - <i>ilvM</i>	High-copy-nb. Expression vector for the <i>ilvM</i> gene; <i>amp</i> ^R	This study
pSE380 Δ NcoI - <i>ilvD</i>	High-copy-nb. Expression vector for the <i>ilvD</i> gene; <i>amp</i> ^R	This study
pET-28a – <i>ilvB</i>	Expression vector for the <i>ilvB</i> gene with a N-terminal His tag; <i>Kan</i> ^R	This study
pET-28a – <i>ilvN</i>	Expression vector for the <i>ilvN</i> gene with a N-terminal His tag; <i>Kan</i> ^R	This study

pET-28a – ilvH	Expression vector for the <i>ilvH</i> gene with a N-terminal His tag; <i>Kan</i> ^R	This study
pET-28a – ilvI	Expression vector for the <i>ilvI</i> gene with a N-terminal His tag; <i>Kan</i> ^R	This study
pET-28a – ilvG	Expression vector for the <i>ilvG</i> gene with a N-terminal His tag; <i>Kan</i> ^R	This study
pET-28a - ilvM	Expression vector for the <i>ilvM</i> gene with a N-terminal His tag; <i>Kan</i> ^R	This study
pCP20	Plasmid encoding Flp-recombinase, <i>amp</i> ^R , <i>camR</i>	(Datsenko and Wanner 2000)
pKD4	Template plasmid for amplification of <i>kan</i> , <i>kan</i> ^R , <i>amp</i> ^R	(Datsenko and Wanner 2000)
RT-qPCR Primer		
P1	TACGCTGAAAGGGCTGGGCG	This study
P2	CCTGCACCGCGAAGTTTGCC	This study
P3	GCCCACACTCGCCCGGAAAA	This study
P4	GGTATCGTTCGGTCGCGCGA	This study
P5	CAGGTCAATGTATCGGCTCGCT	This study
P6	GCGGCGGCCATATTCATTGAGC	This study
P7	TGCCAGAGCACAACCACATCAC	This study
P8	CGTCTTCCCAGCGAACCATCTC	This study
P9	CGACTCGCACAAAGGACCGGT	This study
P10	TCTGCGAAACCGGGAAGCGA	This study
P11	TGGATCGCGCGGGGTTACTG	This study
P12	CGCGTCATCCTGGGTCAGCA	This study
P13	CTGCACAACATTCGCGGCGA	This study
P14	CTGTTGCCCCAGTTGCGAGC	This study
Q-ihfB-5'	GCCAAGACGGTTGAAGATGC	(Enjalbert <i>et al.</i> 2013)
Q-ihfB-3'	CAAAGAGAAACTGCCGAAACC	(Enjalbert <i>et al.</i> 2013)
Primer		
ilvG-5'	AACAGCACAAAATTCTGTTTCTCAAGATTCAGGACGG GGAACATACTATGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
ilvG-3'	GCGAGCCGATACATTGACCTGATGTTGCATCATGATA ATTTCTCCAACATCATATGAATATCCTCCTTAG	This study

- **Identification des voies de synthèse**

Dans une étude récente, du propionyl-CoA a été détecté dans des cellules d'*E. coli* cultivées sur glucose en condition aérobie (Fatarova 2017). Cette observation suggère qu'une ou plusieurs voies métaboliques permettent sa formation. Aussi, ce volet de l'étude a pour objectif de clarifier l'origine et le devenir du propionyl-CoA. Au total, quatre voies peuvent conduire à la formation de propionyl-CoA (**Figure 20**).

La première est la voie du 2-méthylcitrate. Il est décrit que le propionate peut être ainsi être métabolisé en condition aérobie, par cette voie, dont les enzymes sont codées sur l'opéron *prpBCDE*. Toutefois, l'expression de cet opéron serait soumise à la répression catabolique exercée par le glucose dans la mesure où un site de reconnaissance de CRP (c-AMP receptor protein) a été identifié dans la région promotrice du gène (Lee and Keasling 2005). Il est à noter que la réaction de formation du propionyl-CoA à partir de propionate, catalysé par l'enzyme PrpE est similaire à celle catalysée par l'acétyl-CoA synthétase (Acs) et consomme de l'énergie sous forme d'ATP (Brock *et al.* 2002).

Une deuxième voie implique un cycle de conversion du succinate en propionate via un autre opéron constitué de 4 gènes : *scpA*, *scpB*, *scpC* et *argK*. Mise en évidence par (Haller *et al.* 2000), cette voie n'a pas de rôle métabolique établi pour l'instant.

Une autre possibilité pour la synthèse du propionyl-CoA est la voie de dégradation de la thréonine. Cette voie, dont le précurseur est le ketobutyrate, est codée par l'opéron *tdcABCDEFG*. Celui-ci est converti par TdcE (**Figure 41**) en propionyl-CoA, avec une co-formation de formate (Simanshu *et al.* 2007). Cette voie qui est connue pour dégrader la thréonine en anaérobie, et est également régulée par la répression catabolique. Il est à noter que cette enzyme tout comme PflB (qui peut aussi catalyser cette réaction) est régulée par PflA.

Enfin, une autre voie peut consister en la formation de propionyl-P par AckA et sa conversion en propionyl-CoA par Pta, de manière similaire à la voie d'assimilation d'acétate. A l'instar de ce qui a été décrit pour l'acétate, cette voie est essentiellement envisagée dans la littérature, pour la production de propionate à partir de propionyl-CoA, plutôt que pour la formation de propionyl-CoA à partir de propionate.

- **Mécanisme de formation**

Pour déterminer quelle(s) voie(s) permet(ent) la formation du propionyl-CoA, différents mutants provenant de la banque Keio (Baba *et al.* 2006) et correspondant aux différentes voies possibles ont été utilisé (**Figure 41**). De plus et afin de limiter le nombre de souches une première expérience en présence d'isoleucine a été réalisé. Comme expliqué précédemment, l'ajout d'isoleucine empêche la synthèse de 2-ketobutyrate et par conséquent la synthèse de propionyl-CoA via la voie de BCAA (**Figure 42 B**). Cette expérience prouve que le propionyl-CoA est intégralement synthétisé par cette voie et a donc permis d'exclure le cycle du succinate. Ces souches ont toutes été cultivées en micro bioréacteur et échantillonnées à une DO₆₀₀ de 1,2. La quantification du propionyl-CoA a été réalisée par LC-MS selon le protocole établi par Maria Fatarova (Maria 2017) (**Figure 42**). Trois conditions ont été analysées pour déterminer quelle(s) voie(s) et/sont capable(s) de former du propionyl-CoA : Milieu M9-glucose, milieu M9-glucose supplémenté avec de l'isoleucine pour bloquer la voie des BCAA (contrôle négatif), et milieu M9-glucose supplémenté en isoleucine et

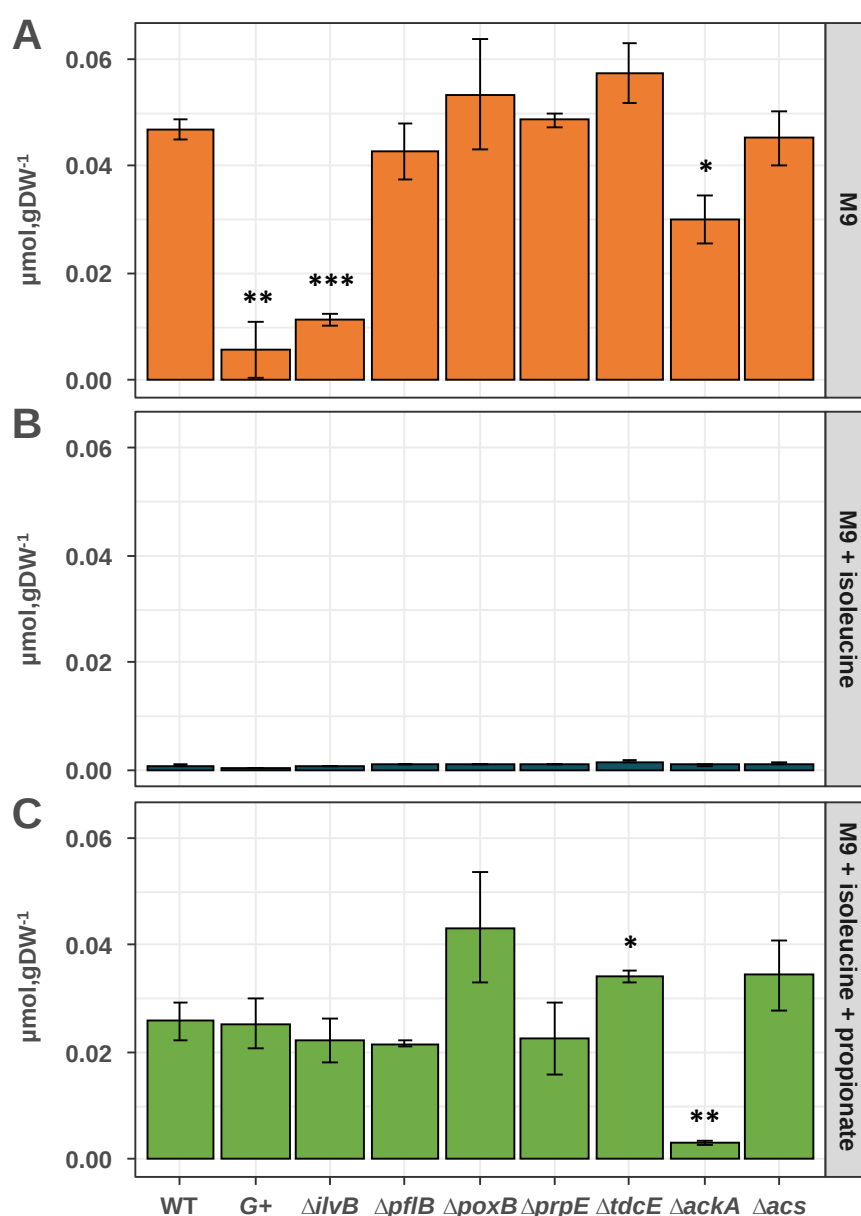


Figure 42 : Quantification intracellulaire du propionyl-CoA dans la souche WT et différents mutants dans 3 conditions. A: milieu minimum M9, B: M9 supplémenté en isoleucine (6 mM), C: M9 supplémenté en isoleucine et propionate (10 mM). p-value calculée par rapport à la condition WT avec * > 0.05 ; ** > 0.01 ; *** > 0.001

propionate. Sur milieu minimum, parmi les mutants étudiés, les mutants $\Delta pfkB$, $\Delta poxB$, $\Delta prpE$, $\Delta tdcE$, et Δacs présentent des concentrations intracellulaires en propionyl-CoA similaires à celle de la souche sauvage (**Figure 42 A**). Les voies liées à ces mutations ne sont donc pas ou peu impliquées dans le processus de formation de ce métabolite. La présence d'isoleucine dans le milieu conduit à l'inhibition de TDA et,

par conséquent, bloque le flux au travers de la voie de synthèse de l'isoleucine. Ainsi en présence d'isoleucine dans le milieu, la concentration intracellulaire en propionyl-CoA chez la souche WT comme pour l'ensemble des mutants est proche du bruit de fond ce qui confirme que la voie des BCAA, *via* le 2-ketobutyrate, est impliquée dans sa formation (**Figure 42 B**). L'activité promiscuitaire des AHAS démontrée précédemment (**Chapitre 4.1**) conduit à la formation de propionate par décarboxylation du 2-ketobutyrate. D'ailleurs, il est à noter que la modification du pool d'AHAS, soit par l'inactivation de l'AHASI (IlvB), soit par la restauration de l'AHASII (G+), permet d'observer une diminution très significative de la concentration intracellulaire en propionyl-CoA. Sa présence intracellulaire nécessite l'activation métabolique du propionate *via* les enzymes PrpE et Acs, ou bien par la voie Pta-AckA (**Figure 41**). Seul le mutant *ackA*, qui rend inactive la voie Pta-AckA, induit une diminution significative de la concentration intracellulaire en propionyl-CoA. Pour confirmer le rôle d'AckA dans la transformation du propionate en propionyl-CoA, des croissances en présence d'isoleucine et de propionate, en plus du glucose, ont été réalisées. Dans cette condition, la concentration intracellulaire en propionyl-CoA est significativement plus faible chez le mutant *ackA* (p-value : 7,67E-03), confirmant que le propionate est essentiellement obtenu *via* les AHAS. Enfin une augmentation significative de la concentration intracellulaire est à noter avec le mutant $\Delta tdcE$. La contribution de l'enzyme TdcE reste néanmoins à confirmer dans la mesure où cette enzyme est censée n'être active qu'en condition anaérobie.

Certains organismes comme *Yarrowia lipolytica* sont capables de produire des acides gras impairs. Toutefois, chez *E. coli*, cette production n'est pas clairement rapportée, et le rôle métabolique de du propionyl-CoA est encore à élucider. On peut toutefois noter que la délétion du gène *tdcE* induit une augmentation du pool intracellulaire. On

peut donc supposer que le propionyl-CoA est ensuite recyclé et réinjecté dans la voie des BCAA via le 2-ketobutyrate. Comme expliqué durant le **chapitre 4.1** la promiscuité enzymatique joue un rôle primordial dans la régulation de la voie de BCAA. La production de propionate par les AHAS ainsi que sa conversion en propionyl-CoA laisse à penser qu'une boucle de régulation, complétée par l'enzyme TdcE, permettrait à la voie des BCAA d'évacuer une partie du flux provenant de TDA et de le stocker sous forme de propionate afin de le réassimiler dans un second temps.

Abell, L. M. and J. V. Schloss (1991). "Oxygenase side reactions of acetolactate synthase and other carbanion-forming enzymes." Biochemistry **30**(32): 7883-7887.

Angles, F., M. P. Castanie-Cornet, N. Slama, M. Dinclaux, A. M. Cirinesi, J. C. Portais, F. Letisse and P. Genevaux (2017). "Multilevel interaction of the DnaK/DnaJ(HSP70/HSP40) stress-responsive chaperone machine with the central metabolism." Sci Rep **7**: 41341.

Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner and H. Mori (2006). "Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.

Barak, Z., D. M. Chipman and N. Gollop (1987). "Physiological implications of the specificity of acetohydroxy acid synthase isozymes of enteric bacteria." J Bacteriol **169**(8): 3750-3756.

Brock, M., C. Maerker, A. Schutz, U. Volker and W. Buckel (2002). "Oxidation of propionate to pyruvate in Escherichia coli. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase." Eur J Biochem **269**(24): 6184-6194.

Chen, X., L. Zhou, K. Tian, A. Kumar, S. Singh, B. A. Prior and Z. Wang (2013). "Metabolic engineering of Escherichia coli: a sustainable industrial platform for bio-based chemical production." Biotechnol Adv **31**(8): 1200-1223.

Chipman, D., Z. Barak and J. V. Schloss (1998). "Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases." Biochim Biophys Acta **1385**(2): 401-419.

Christodoulou, D., H. Link, T. Fuhrer, K. Kochanowski, L. Gerosa and U. Sauer (2018). "Reserve Flux Capacity in the Pentose Phosphate Pathway Enables Escherichia coli's Rapid Response to Oxidative Stress." Cell Syst **6**(5): 569-578 e567.

Chubukov, V., L. Gerosa, K. Kochanowski and U. Sauer (2014). "Coordination of microbial metabolism." Nat Rev Microbiol **12**(5): 327-340.

Daniel, J., L. Dondon and A. Danchin (1983). "2-Ketobutyrate: a putative alarmone of Escherichia coli." Mol Gen Genet **190**(3): 452-458.

Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-6645.

De Felice, M., M. Levinthal, M. Iaccarino and J. Guardiola (1979). "Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in Escherichia coli K-12." Microbiol Rev **43**(1): 42-58.

Donati, S., T. Sander and H. Link (2018). "Crosstalk between transcription and metabolism: how much enzyme is enough for a cell?" Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med **10**(1): e1396.

Enjalbert, B., F. Letisse and J. C. Portais (2013). "Physiological and Molecular Timing of the Glucose to Acetate Transition in Escherichia coli." Metabolites **3**(3): 820-837.

Fatarova, M. (2017). The metabolic consequences of gene knockout to pathway flux in trypanosomes, INSA de Toulouse.

Gollop, N., D. M. Chipman and Z. Barak (1983). "Inhibition of acetohydroxy acid synthase by leucine." Biochim Biophys Acta **748**(1): 34-39.

Gollop, N., B. Damri, Z. Barak and D. M. Chipman (1989). "Kinetics and mechanism of acetohydroxy acid synthase isozyme III from Escherichia coli." Biochemistry **28**(15): 6310-6317.

Haller, T., T. Buckel, J. Retey and J. A. Gerlt (2000). "Discovering new enzymes and metabolic pathways: conversion of succinate to propionate by *Escherichia coli*." Biochemistry **39**(16): 4622-4629.

Hesslinger, C., S. A. Fairhurst and G. Sawers (1998). "Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate." Mol Microbiol **27**(2): 477-492.

Heux, S., J. Poinot, S. Massou, S. Sokol and J. C. Portais (2014). "A novel platform for automated high-throughput fluxome profiling of metabolic variants." Metab Eng **25**: 8-19.

LaRossa, R. A., T. K. Van Dyk and D. R. Smulski (1987). "Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **169**(4): 1372-1378.

Lawther, R. P., D. H. Calhoun, C. W. Adams, C. A. Hauser, J. Gray and G. W. Hatfield (1981). "Molecular basis of valine resistance in *Escherichia coli* K-12." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(2): 922-925.

Lawther, R. P., D. H. Calhoun, J. Gray, C. W. Adams, C. A. Hauser and G. W. Hatfield (1982). "DNA sequence fine-structure analysis of *ilvG* (*IlvG*+) mutations of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **149**(1): 294-298.

Lawther, R. P. and G. W. Hatfield (1980). "Multivalent translational control of transcription termination at attenuator of *ilvGEDA* operon of *Escherichia coli* K-12." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 1862-1866.

Lee, S. K. and J. D. Keasling (2005). "A propionate-inducible expression system for enteric bacteria." Appl Environ Microbiol **71**(11): 6856-6862.

Letisse, F. (2000). Quantification des contraintes métaboliques associées à la production de gomme xanthane par *Xanthomonas campestris*.

Liu, Y., Y. Li and X. Wang (2016). "Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function." Appl Microbiol Biotechnol **100**(20): 8633-8649.

Liu, Y., Y. Li and X. Wang (2017). "Molecular evolution of acetohydroxyacid synthase in bacteria." Microbiologyopen **6**(6).

Maria, F. (2017). Analyse de l'impact de perturbations génétiques sur les flux métaboliques de trypanosomes.

Park, J. H., K. H. Lee, T. Y. Kim and S. Y. Lee (2007). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7797-7802.

Peiro, C., P. Millard, A. de Simone, E. Cahoreau, L. Peyriga, B. Enjalbert and S. Heux (2019). "Chemical and Metabolic Controls on Dihydroxyacetone Metabolism Lead to Suboptimal Growth of *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **85**(15).

Rasmussen, L. J., P. L. Moller and T. Atlung (1991). "Carbon metabolism regulates expression of the *pfl* (pyruvate formate-lyase) gene in *Escherichia coli*." J Bacteriol **173**(20): 6390-6397.

Reaves, M. L., B. D. Young, A. M. Hosios, Y. F. Xu and J. D. Rabinowitz (2013). "Pyrimidine homeostasis is accomplished by directed overflow metabolism." Nature **500**(7461): 237-241.

Reznik, E., D. Christodoulou, J. E. Goldford, E. Briars, U. Sauer, D. Segre and E. Noor (2017). "Genome-Scale Architecture of Small Molecule Regulatory Networks and the Fundamental Trade-Off between Regulation and Enzymatic Activity." Cell Rep **20**(11): 2666-2677.

Sander, T., N. Farke, C. Diehl, M. Kuntz, T. Glatter and H. Link (2019). "Allosteric Feedback Inhibition Enables Robust Amino Acid Biosynthesis in *E. coli* by Enforcing Enzyme Overabundance." *Cell Syst* **8**(1): 66-75 e68.

Sawers, G. (1998). "The anaerobic degradation of L-serine and L-threonine in enterobacteria: networks of pathways and regulatory signals." *Arch Microbiol* **171**(1): 1-5.

Sawers, G. (2001). "A novel mechanism controls anaerobic and catabolite regulation of the *Escherichia coli* tdc operon." *Mol Microbiol* **39**(5): 1285-1298.

Schmidt, A., K. Kochanowski, S. Vedelaar, E. Ahrne, B. Volkmer, L. Callipo, K. Knoop, M. Bauer, R. Aebersold and M. Heinemann (2016). "The quantitative and condition-dependent *Escherichia coli* proteome." *Nat Biotechnol* **34**(1): 104-110.

Simanshu, D. K., S. Chittori, H. S. Savithri and M. R. Murthy (2007). "Structure and function of enzymes involved in the anaerobic degradation of L-threonine to propionate." *J Biosci* **32**(6): 1195-1206.

Simonte, F. M., A. Dotsch, L. Galego, C. Arraiano and J. Gescher (2017). "Investigation on the anaerobic propionate degradation by *Escherichia coli* K12." *Mol Microbiol* **103**(1): 55-66.

Steinmetz, A., M. Vyazmensky, D. Meyer, Z. E. Barak, R. Golbik, D. M. Chipman and K. Tittmann (2010). "Valine 375 and phenylalanine 109 confer affinity and specificity for pyruvate as donor substrate in acetohydroxy acid synthase isozyme II from *Escherichia coli*." *Biochemistry* **49**(25): 5188-5199.

Umbarger, H. E. and B. Brown (1958). "Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VII. A negative feedback mechanism controlling isoleucine biosynthesis." *J Biol Chem* **233**(2): 415-420.

Valle, J., S. Da Re, S. Schmid, D. Skurnik, R. D'Ari and J. M. Ghigo (2008). "The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biofilms." *J Bacteriol* **190**(1): 264-274.

Volke, D. C., J. Rohwer, R. Fischer and S. Jennewein (2019). "Investigation of the methylerythritol 4-phosphate pathway for microbial terpenoid production through metabolic control analysis." *Microb Cell Fact* **18**(1): 192.

Vyazmensky, M., Y. Zherdev, A. Slutzker, I. Belenky, O. Kryukov, Z. Barak and D. M. Chipman (2009). "Interactions between large and small subunits of different acetohydroxyacid synthase isozymes of *Escherichia coli*." *Biochemistry* **48**(36): 8731-8737.

Yang, C. R., B. E. Shapiro, S. P. Hung, E. D. Mjolsness and G. W. Hatfield (2005). "A mathematical model for the branched chain amino acid biosynthetic pathways of *Escherichia coli* K12." *J Biol Chem* **280**(12): 11224-11232.

Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and D. L. Court (2000). "An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 5978-5983.

Zaslaver, A., A. E. Mayo, R. Rosenberg, P. Bashkin, H. Sberro, M. Tsalyuk, M. G. Surette and U. Alon (2004). "Just-in-time transcription program in metabolic pathways." *Nat Genet* **36**(5): 486-491.

Zhuang, Q. and Q. Qi (2019). "Engineering the pathway in *Escherichia coli* for the synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates consisting of both even- and odd-chain monomers." *Microb Cell Fact* **18**(1): 135.

5. Impact de la disponibilité en fer sur le métabolisme carboné.

5.1. Introduction

- Généralités

Le métabolisme du fer est étroitement interconnecté avec le métabolisme carboné d'*E. coli* bien que cela n'apparaisse pas au premier abord. En effet, ce métal n'intervient pas directement en tant que cofacteur réactionnel libre mais de manière complexé à des protéines, et est indispensable au bon fonctionnement cellulaire. Il intervient à tous les niveaux moléculaires. Au niveau génomique, il est un élément clef dans l'expression des gènes associés aux mécanismes de transition anaérobie/aérobie. La protéine *fnr* en est un exemple. Elle est un senseur de la disponibilité en O₂. La structure de son complexe fer-soufre et dépendante de son état d'oxydation et donc de la présence d'O₂. En conséquence, *fnr* va réguler plus de 700 gènes chez *E. coli* (Salmon *et al.* 2003). Au niveau protéique, le fer intervient directement dans la constitution des protéines fer-soufre. Celles-ci participent à de nombreuses catalyses enzymatiques (déshydratation, désamination...) mais aussi à des transferts d'électrons nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire tout particulièrement.

Les travaux de Tan et de ses collaborateurs (Tan *et al.* 2009), et , dans une moindre mesure, ceux de Macomber and Imlay (Macomber and Imlay 2009) montrent que l'incapacité d'*E. coli* à former des complexes Fe-S fonctionnels a un impact direct sur le fonctionnement de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés (leucine,

valine et isoleucine). En effet, la délétion de gènes dans les systèmes de maturation des complexes [Fe-S] (ISC et SUF) conduit à une auxotrophie pour cette famille d'acides aminés chez *E. coli* (Macomber and Imlay 2009, Tan *et al.* 2009).

Au cours de ce chapitre, les travaux se focalisent principalement sur les conséquences métaboliques d'une carence en fer, et celles, en particulier, au niveau de la voie des BCAA. La première partie de l'étude vise à caractériser le comportement d'*E. coli* vis-à-vis d'environnements plus ou moins appauvris en fer. Pour permettre une croissance optimale d'*E. coli*, l'ordre de grandeur de la concentration extracellulaire en fer sous forme ionisée Fe^{2+} ou Fe^{3+} est de 0.1 μM à 10 μM (Andrews *et al.* 2003). Les milieux de croissance utilisés dans l'équipe d'accueil à TBI en contiennent 10 μM . Dans ces conditions, les bactéries peuvent croître de façon optimale sans être donc limitées par cet oligoélément. Aussi, afin d'étudier l'effet de la disponibilité en fer, les caractéristiques de croissance (taux de croissance, μ ; produits de métabolisme) de la bactérie ont été déterminées dans ces conditions mais également en condition appauvrie en fer dans le milieu de culture (de 50 nM à 0,50 mM), apportées sous forme d'ions Fe^{3+} (FeCl_3). De plus, pour éviter les effets de compétition entre les récepteurs cellulaires au fer (sidérophores et les agents de chélation), les milieux sont préparés en absence de chélateurs comme l'EDTA.

- **Choix des souches**

Plusieurs souches et mutants de la voie de formation des complexes fer-soufre vont être utilisés. Comme dans les chapitres précédents, la souche *E. coli* K-12 MG1655 est le modèle central de l'étude. De plus, la souche ilvG^+ présente un intérêt particulier car il a été démontré que l'activité d'une enzyme à centre Fer-S, la 2,3-

dihydroxyisovalérate déshydratase (DAD) de la voie des BCAA, est plus élevée dans cette souche que dans la souche sauvage.

E. coli K-12 MG1655 n'est cependant pas représentative des bactéries présentes dans la nature, notamment dans le tractus gastro intestinal. Aussi, l'étude a été élargie à des souches commensales du groupe phylogénétique B2 : *E. coli* Nissle 1917 et *E. coli* SE15. La première, de dénomination commerciale Mutaflor®, est considérée comme étant probiotique. Brièvement, pendant la Première Guerre mondiale, en 1917, Alfred Nissle isola cette souche des matières fécales d'un soldat allemand qui, contrairement au reste de son unité, fut le seul à ne pas être contaminé par *Shigella* (Sonnenborn and Schulze 2009). *E. coli* Nissle 1917 (ECN) est encore aujourd'hui administrée par voie orale dans certains pays européens (l'Allemagne, la suisse, la Belgique...) pour soulager les patients atteints de Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI).

La deuxième souche commensale, *E. coli* SE15, est aussi une bactérie du groupe phylogénétique B2. Isolée des fèces d'un homme en bonne santé, puis séquencée (Toh et al. 2010), il apparaît que son génome comporte moins de gènes connus associés à la virulence que d'autres souches commensales telle que ECN, malgré son caractère probiotique.

5.2. Effet de la concentration en fer sur la croissance d'*E. coli* K-12 MG1655

La croissance d'*E. coli* K-12 MG1655 a été caractérisée en présence de différentes concentrations extracellulaires en ions Fe^{3+} . Celle-ci consiste non seulement en un suivi de l'évolution de la turbidimétrie (à 600nm) au cours du temps, mais également en la quantification de la concentration des substrats (glucose principalement) et des produits présents dans le milieu de culture au cours du temps.

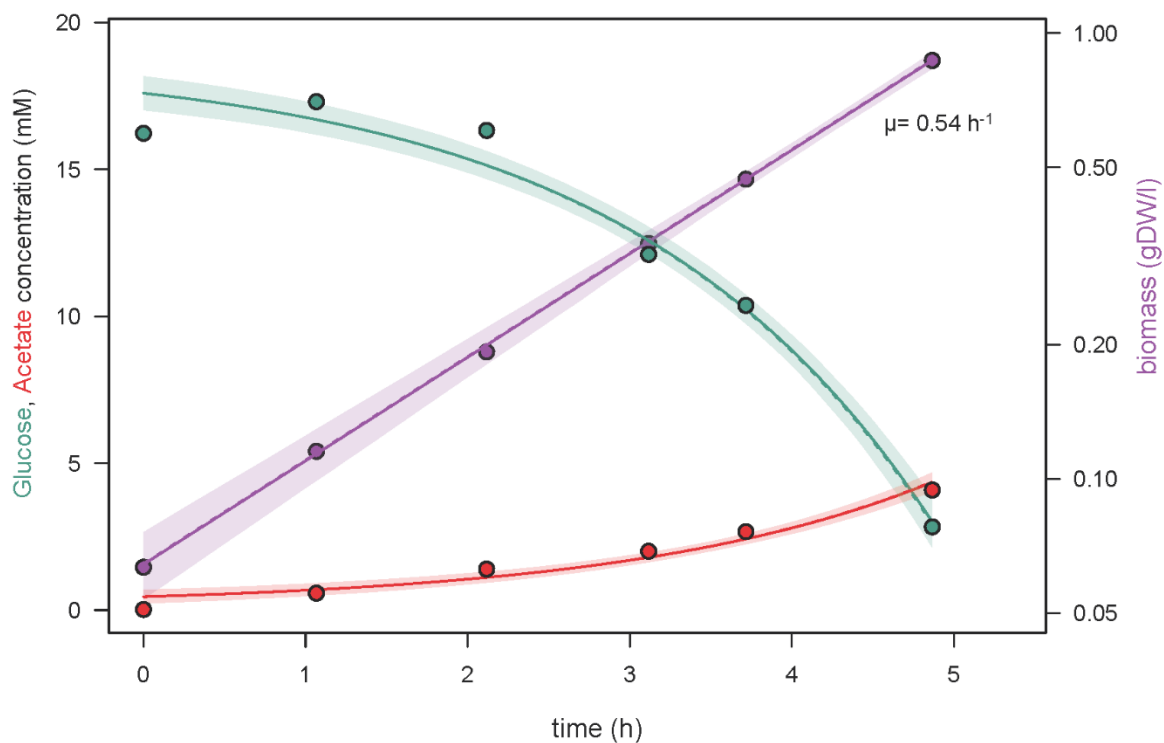


Figure 43: Evolution au cours du temps de la consommation de glucose, de la production d'acétate et de la concentration biomasse d'*E. coli* K-12 MG1655 cultivée sur glucose avec 10 µM de Fe^{3+} .

La **Figure 43** présente un exemple de suivi de croissance obtenue pour une concentration en Fe^{3+} de 10µM. Sur ce graphique, la concentration en glucose diminue au cours du temps et devient nulle vers $t=5\text{h}$. La concentration en biomasse augmente de manière exponentielle au cours du temps, parallèlement à la

concentration en acétate ; atteignant respectivement 0,87 g.L⁻¹ et 2,8 mM au moment de l'épuisement du glucose. Ce profil est caractéristique de la croissance exponentielle d'*E. coli* sur glucose où l'augmentation de la biomasse s'accompagne d'une accumulation d'acétate. Une fois le glucose totalement consommé, la concentration en acétate diminue ; l'acétate sert alors à la fois de source carbone et d'énergie. Le taux de croissance est calculé à partir de l'évolution de la concentration en biomasse au cours du temps selon une loi exponentielle : $X = X_0 \times \exp(\mu \cdot t)$ où X est la concentration en biomasse en g_{CDW}.L⁻¹ ; X_0 , la concentration initiale en biomasse ; t , le temps et μ le taux de croissance (en h⁻¹). Les écart-types sont calculés par une analyse statistique « Monte-Carlo », réalisée sous R avec le script Physiofit (qui a été développé dans l'équipe METASYS (Peiro *et al.* 2019)).

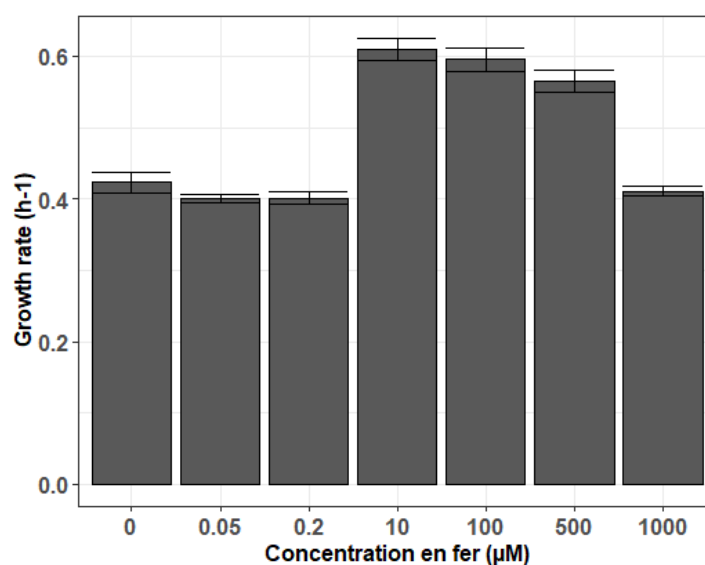


Figure 44: Taux de croissance d'*E. coli* K-12 MG1655 WT à différentes concentrations en Fe³⁺.

La **Figure 44** présente les taux de croissance obtenus en présence des différentes concentrations extracellulaires en Fe³⁺. A pH 7, pour une densité de 10⁹ cellules.mL⁻¹, une génération d'*E. coli* utilise 10¹⁸ molécules de fer.L⁻¹ (Andrews *et al.* 2003). Compte tenu de la solubilité du fer, il est nécessaire qu'il soit à une

concentration de 10 μM dans le milieu pour permettre une croissance optimale. Comme on peut le constater sur la **Figure 44** au-delà de 10 μM , le taux de croissance de la souche *E. coli* MG1655 est de 0.60 h^{-1} et n'évolue pas en présence d'une concentration supérieure en Fe^{3+} . Ces résultats indiquent que la quantité de Fe^{3+} n'a plus d'effet sur la capacité de croissance de la bactérie. Les conditions 100 et 500 μM de fer peuvent être considérées comme riches en fer, comparées aux besoins théoriques de la bactérie. Il n'est pas surprenant de ne pas observer de changement à des concentrations en Fe^{3+} si élevées. A 1000 μM , le taux de croissance est significativement réduit. Plus qu'une toxicité, cette baisse est attribuée à une concentration trop élevée en fer provoquant sa précipitation. Sous cette forme le fer n'est plus disponible et ne peut donc plus être assimilé par la bactérie. Le taux de croissance est alors proche de celui déterminé lorsque la concentration en Fe^{3+} de 0,2 μM , correspondant à 70% du taux de croissance mesuré à 10 μM . Pour des concentrations en fer encore plus réduite, le taux de croissance ne diminue pas significativement et est de $0,42 \text{ h}^{-1}$ sans ajout de Fe^{3+} dans le milieu de culture. Néanmoins, la diminution de la concentration en Fe^{3+} dans le milieu a un effet sur le taux de croissance d'*E. coli* MG1655. Par ailleurs, l'observation d'une croissance significative de la bactérie sans ajout de Fe^{3+} sur l'équivalent de 4 générations est particulièrement intéressante et peut apparaître comme inattendue dans la mesure où le fer est un élément essentiel à la croissance de la bactérie et qu'une carence en ce métal pourrait induire un ralentissement voire un arrêt de la croissance de la bactérie.

Ce résultat indique que la bactérie :

- i) possède des réserves internes en fer suffisamment conséquentes pour assurer la croissance sur 4 générations de bactérie,
- ii) est capable de relocaliser le fer intracellulaire, voire de mobiliser d'autres ions métalliques (Cu^{2+} , Zn^{2+}), vers des fonctions cellulaires qui lui permettent d'assurer sa croissance,
- iii) qu'une source de Fe^{3+} autre que le FeCl_3 assure un apport en Fe^{3+} suffisant pour assurer la croissance sur quelques générations

Bien que les milieux de cultures ont été systématiquement préparés avec de l'eau ultrapure et des produits de pureté les plus élevés, la consolidation de ces résultats nécessite de préparer les milieux de culture en éliminant toute trace d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , tel que cela est décrit dans (Folsom *et al.* 2014).

5.3. Analyse de l'exométabolome

- **Identification des métabolites**

L'analyse par RMN 1D- ^1H des surnageants de culture est une approche sans *a priori* permettant de détecter et de quantifier les produits du métabolisme. Ceci est réalisable à condition qu'ils contiennent au moins un proton, qu'ils soient hydrosolubles et présents à des concentrations supérieures au seuil de sensibilité et de quantification. Ainsi, la séquence RMN mise en place permet en routine de détecter, en plus du glucose et de la thiamine, l'acétate, l'éthanol, l'acétate, l'orotate, pyruvate, succinate, *etc.* Ce sont tous des produits généralement présents dans les surnageants de culture d'*E. coli* K-12 MG1655 en milieu minimum et en aérobie.

En plus de ces métabolites extracellulaires, l'analyse des spectres RMN révèle la présence d'autres molécules. Ces composés sont notamment détectables dans des

échantillons prélevés en fin de culture et en conditions de faibles concentrations en Fe^{3+} dans le milieu de culture (inférieur 10 μM). L'élucidation de leur structure a donné lieu à une étude RMN conséquente décrite dans le **Chapitre 4.1** qui a permis d'identifier le 2,3-dihydroxy-isovalerate (DHIV) et le 2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate (DHMP). De plus, au cours de cultures carencées en fer, le 2-Isopropylmalate (2-IPM) a également pu être identifié. Contrairement au DHIV et DHMP, le 2-IPM n'est pas détectable dans des conditions classiques de culture bactérienne. De manière intéressante, ce métabolite est le substrat de l'isopropylmalate isomerase, une enzyme à centre fer-soufre impliquée dans la voie de biosynthèse de la leucine (**Figure 35**). Son activité, comme toute protéine à centre fer-soufre, dépend de la capacité d'*E. coli* à former ces complexes. C'est pourquoi, lors de carences en fer il n'est pas étonnant de détecter une accumulation de 2-IPM. Cette accumulation peut toutefois être réprimée si le milieu contient de la leucine ou de la valine en raison du rétrocontrôle de la 2-isopropylmalate synthase et des AHAS respectivement exercé par ces acides aminés. Son identification a été confirmée par l'analyse RMN de solutions préparées à partir de produits commercialement disponibles ainsi qu'en mélange avec les surnageants de cultures, pour se placer dans des conditions physico-chimiques identiques à celles qui ont permis l'élucidation de sa structure.

De manière extrêmement intéressante, il est à noter que ces trois molécules s'accumulent à des concentrations très significatives (de l'ordre du 300 μM et même 1mM pour le DHIV). De plus, ces composés ne sont pas utilisés après la consommation totale du glucose (résultats non présentés), et sont tous des intermédiaires métaboliques de la voie des BCAA. L'absence d'accumulation extracellulaire de métabolites issus d'autres voies métaboliques indique qu'il existe un

lien étroit entre la voie de biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA) et le métabolisme du fer.

- **Quantification des produits du métabolisme selon la disponibilité en fer**

L'analyse RMN décrite précédemment révèle la présence de trois intermédiaires métaboliques de la voie des BCAA (DHIV, DHMP et 2-IPM), lorsque la concentration extracellulaire en Fe^{3+} est de $0.2 \mu\text{M}$. Ces trois métabolites ont donc été quantifiés pour l'ensemble des expériences de limitation en fer.

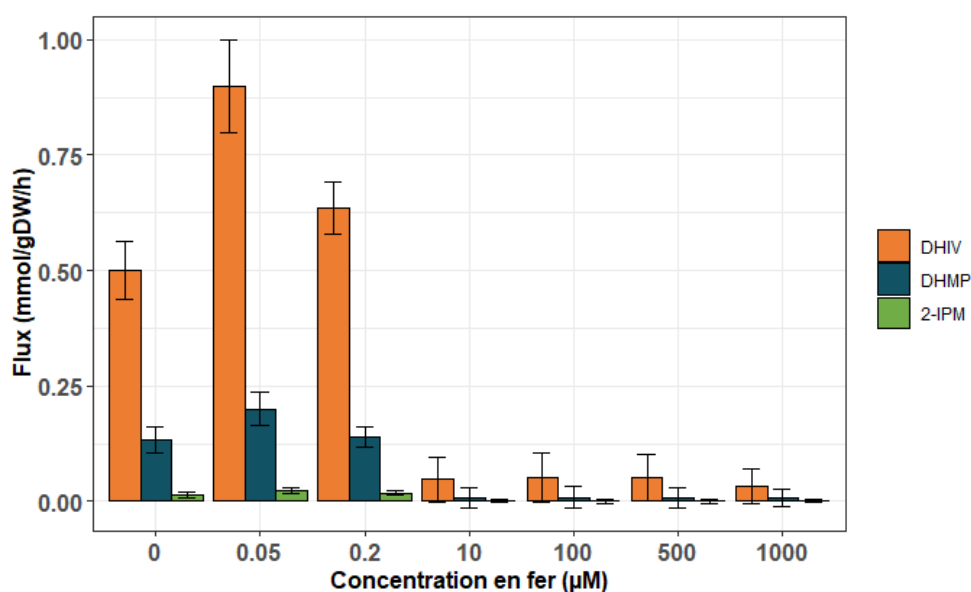


Figure 45: Quantification des flux de métabolites de la voie des BCAA chez *E. coli* K-12 MG1655 WT pour différentes concentrations en Fe^{3+} en triplicat.

Les résultats de ces analyses sont présentés **Figure 45**. Cette figure présente les flux de production du DHIV, DHMP et du 2-IPM en fonction de la concentration en Fe^{3+} ajoutée dans le milieu. En présence de concentrations en $\text{Fe}^{3+} \leq 10 \mu\text{M}$, un flux d'accumulation très significatif de DHIV est observé, qui atteint $0,90 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$, ce qui correspond en fin de croissance à $1,62 \text{ mM}$ lorsque la concentration en Fe^{3+} est de $0,05 \mu\text{M}$. Cependant, on peut constater que le flux d'accumulation de DHIV est

beaucoup plus faible ($0,05 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$) si la bactérie se développe en présence de concentrations plus élevées en fer ($\geq 10 \text{ }\mu\text{M}$). Ainsi, le rapport d'accumulation de DHIV entre les conditions les plus pauvres en fer avec celles les plus riches est d'environ 20. L'accumulation du DHMP suit le même profil que celui du DHIV. Pour de faibles concentrations en fer, on note un flux d'accumulation de ce métabolite de $0,20 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$, soit $0,36 \text{ mM}$ de DHMP. Toutefois, l'accumulation du DHMP est réduite en présence de concentrations croissantes en ion ferrique. On peut noter un rapport 21 entre les conditions les plus pauvres en fer avec celles les plus riches à l'instar de ce qui est observé pour le DHIV. De manière remarquable, le rapport entre les flux d'accumulation de DHIV et de DHMP (deux intermédiaires métaboliques substrats de la même enzyme (la DAD) est constant, et proche de 4,5 quelle que soit la concentration extracellulaire en Fe^{3+} . Enfin, la présence de 2-IPM n'est détectée que pour des concentrations en Fe^{3+} inférieures à $10 \mu\text{M}$. Le flux de production est proche de $0,02 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$, soit une concentration finale de $50 \text{ }\mu\text{M}$ en 2-IPM. Cette molécule n'est plus détectable pour des concentrations en fer égales ou supérieures à $10 \text{ }\mu\text{M}$. Comme mentionné précédemment, aucune autre accumulation significative de produits n'est détectée dans le milieu de culture.

Ces résultats indiquent que la modification de la disponibilité extracellulaire en fer induit une accumulation d'intermédiaires métaboliques de la voie des acides aminés branchés. Ces intermédiaires sont des substrats des deux enzymes [Fe-S] de cette voie métabolique. De manière générale, la détection d'un intermédiaire métabolique dans le milieu de culture peut indiquer que l'activité de l'enzyme dont l'intermédiaire est le substrat, est insuffisante pour assurer le flux intracellulaire de transformation de cet intermédiaire en son produit et devient alors limitante. Pour

éviter une accumulation qui pourrait être toxique pour la cellule, celle-ci excrète ce métabolite dans le milieu extérieur (Pinu *et al.* 2018).

Dans le cas qui nous intéresse ici, un lien peut être établi entre l'accumulation de DHIV, DHMP et de 2-IPM avec la teneur en fer dans le milieu de culture. Lorsque le milieu est pauvre en fer, les deux enzymes à centre [Fe-S] deviennent limitantes car la concentration en fer n'est plus suffisante pour assurer la maturation efficace des complexes [Fe-S] de ces enzymes. Lorsque le milieu est riche en fer, l'activité de ces enzymes n'est plus limitante ce qui explique pourquoi le DHIV, le DHMP et le 2-IPM sont détectés en moindre mesure. Ces résultats montrent que la disponibilité en fer a un impact sur le fonctionnement de la voie des acides aminés branchés, et confirment les résultats de Tan et collaborateurs (2009) ainsi que ceux de Macomber and Imlay (2009).

Néanmoins, en conditions de concentrations élevées en Fe^{3+} dans le milieu de culture ($>10\mu\text{M}$), une accumulation de DHIV et de DHMP est encore observée ($133\mu\text{M}$ et $32\mu\text{M}$ respectivement). Ceci indique que la 2,3-dihydroxy-acide déshydratase reste partiellement limitante, comme démontré dans le **Chapitre 4**.

Ces résultats permettent de conclure que non seulement l'accumulation de DHIV et DHMP est bien associée à la voie des acides aminés branchés, mais aussi que l'activité limitante de la 2,3-dihydroxy-acide déshydratase, dont ils sont le substrat, exacerbe leur accumulation lors de carences en fer.

5.4. Effet de l'absence de sidérophore sur la croissance d'*E. coli*

La souche *E. coli* K-12 MG1655 n'est capable de produire que le sidérophore enterobactine. Ce chélateur est produit grâce à un enchaînement de réactions métaboliques dans une voie dérivant du chorismate. Il est considéré dans la littérature que la biosynthèse d'entérobactine, et des sidérophores en général, est déclenchée par une limitation en fer (Neilands 1995). La détection de DHIV et de DHMP dans les surnageants de culture en présence de concentration élevée en Fe^{3+} , suggère que le fer peut être limitant. Aussi, le comportement de croissance et le profil de métabolites excrétés ont été étudiés pour une souche *E. coli* K-12 MG1655, dont l'un des gènes codant pour une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'entérobactine a été enlevé du génome. Il s'agit du gène *entE* codant pour l'entérobactine synthase E. La souche *E. coli* K-12 MG1655 ΔentE n'est alors plus capable de produire l'entérobactine (Martin *et al.* 2013).

- **Croissance de *E. coli* K-12 MG1655 ΔentE**

De la même façon que pour la souche sauvage *E. coli* K-12 MG 1655, le taux de croissance de la souche mutante a été déterminé en présence de différentes concentrations en Fe^{3+} .

La **Figure 46** présente l'ensemble des taux de croissance obtenus sur la gamme de concentration en Fe^{3+} testée. On constate immédiatement que l'absence du gène *entE* conduit à une diminution très conséquente du taux de croissance d'*E. coli*. Le taux de croissance de la souche mutante est de $0,20 \text{ h}^{-1}$ quelle que soit la concentration en Fe^{3+} , soit seulement 36% de celui mesuré pour la souche sauvage

en condition riche en Fe^{3+} . Ces résultats montrent clairement que la croissance *E. coli* K-12 MG1655 ΔentE est fortement affectée, vraisemblablement par l'incapacité à produire les sidérophores et donc à capter le fer. Ils suggèrent aussi que les sidérophores sont produits par la souche sauvage, même en conditions riches en fer *i.e.* à des concentrations $\geq 10\mu\text{M}$, ce qui apparaît comme contradictoire avec ce qui est rapporté dans la littérature (Hartmann and Braun 1981, Watts *et al.* 2012). Enfin, la croissance significative, bien que faible pour ces mutants, suggère que des systèmes secondaires d'assimilation du fer sont effectif dans cette souche.

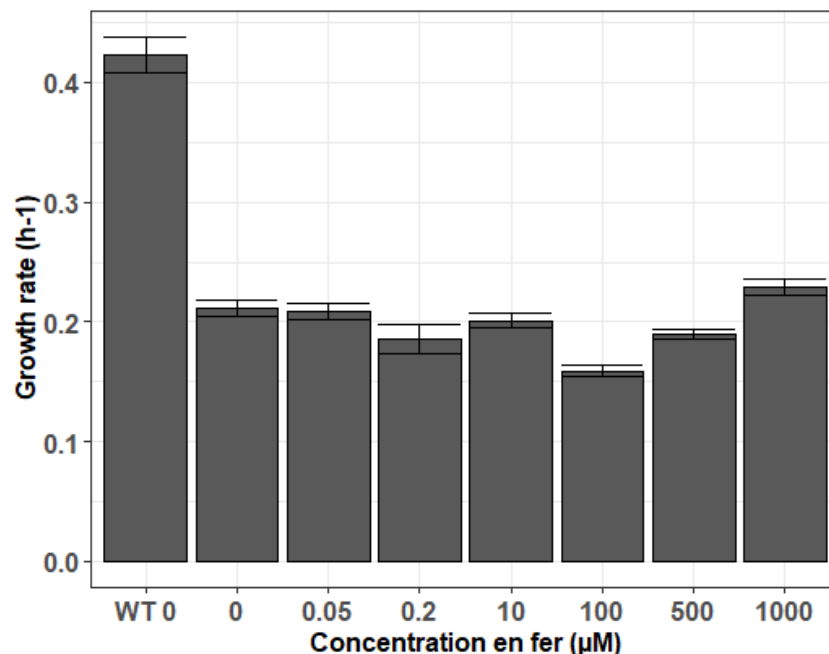


Figure 46: Taux de croissance d'*E. coli* K-12 MG1655 ΔentE à différentes concentrations en Fe^{3+} .

- **Exométabolome d'*E. coli* K-12 MG1655 ΔentE**

La croissance de la souche d'*E. coli* K-12 MG1655 ΔentE est fortement affectée vraisemblablement par la perte de sa capacité à capter le Fe^{3+} avec l'entérobactine. L'analyse des surnageants de culture par RMN a été réalisée pour caractériser le profil des produits du métabolisme excrété par la cellule.

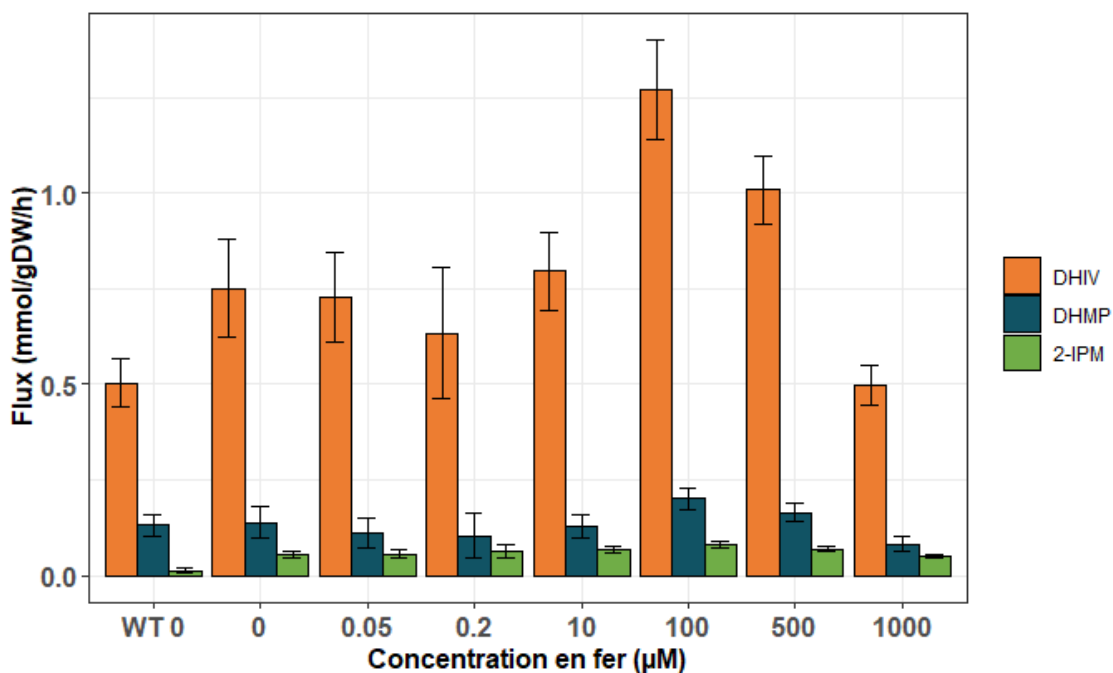


Figure 47: Quantification des flux de métabolites de la voie des BCAA chez *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta entE$ pour différentes concentrations en Fe^{3+} en triplicat.

La **Figure 47** présente le profil de production du DHIV, du DHMP et du 2-IPM en fonction de la concentration initiale en Fe^{3+} dans le milieu de culture. Chez la souche *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta entE$, le DHIV est massivement détecté dans les surnageants indépendamment de la concentration en Fe^{3+} . Pour cette souche, le flux de production du DHIV est relativement constant, et est proche de $0,75 \text{ mmol.g}_{CDW} \cdot h^{-1}$, et la concentration finale atteint 2,4 mM. Cette valeur est du même ordre de grandeur que le flux d'accumulation de ce métabolite par la souche sauvage lors d'une forte restriction en ions ferriques. La production du DHMP suit le même profil que celle de DHIV. Quelle que soit la concentration en Fe^{3+} dans le milieu de culture, le flux d'accumulation de ce métabolite est de $0,14 \text{ mmol.g}_{CDW} \cdot h^{-1}$, et la concentration finale mesurée en fin de culture, est proche de 0,400 mM. De la même façon que pour le DHIV, la modification des conditions de concentration en Fe^{3+} n'affecte pas le rendement de production de ce métabolite. Le rapport entre le rendement

d'accumulation de DHIV et celui du DHMP est donc constant selon la concentration en Fe^{3+} et proche de 5, donc finalement peu différent de celui mesuré avec la souche sauvage. Enfin, le 2-IPM s'accumule de manière plus conséquente dans les surnageants de culture de la souche mutante que dans ceux de la souche sauvage ($0,055 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$ contre $0,02 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$ pour la souche sauvage).

Ces résultats montrent clairement que la délétion du gène *entE* entraîne une amplification du phénomène d'accumulation des intermédiaires métaboliques de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés. Ils confirment que les deux enzymes fer-soufre de cette voie métabolique sont limitantes lors de carences en fer, vraisemblablement par l'incapacité à générer le complexe [4Fe-4S].

Par ailleurs, l'analyse RMN révèle que des quantités plus importantes de lactate et d'acétate sont présentes dans les surnageants de culture : pour $10 \mu\text{M}$ de Fe^{3+} , $7,6 \text{ mM}$ d'acétate et $1,3 \text{ mM}$ de lactate, soient respectivement 2 fois et 65 fois plus que la production relevée chez la souche sauvage. Ce résultat est particulièrement intéressant car il suggère une modification en profondeur du métabolisme à l'instar des résultats rapportés très récemment par (Folsom *et al.* 2014). En effet, en conditions de forte limitation en fer obtenues en culture aérobie de type « chemostat », le métabolisme d'*E. coli* K-12 MG1655 ΔentE est de type fermentaire (accumulation de lactate, augmentation de la vitesse de consommation de glucose), alors qu'il est clairement respiratoire en conditions normales. Ce comportement s'explique notamment par l'incapacité de la bactérie à mettre en place une chaîne respiratoire efficace, voire fonctionnelle (nombreuses protéines Fe-S impliquées dans le transfert d'électrons), par une baisse de l'activité métabolique du cycle de Krebs liée à une diminution de l'activité de l'aconitase et de la succinate déshydrogénase (deux protéines Fe-S). Par conséquent, ceci entraîne une forte

diminution de la production d'ATP par oxydation phosphorylante. Ainsi, la production d'ATP devient majoritairement liée au substrat au niveau de la glycolyse et la voie de synthèse d'acétate dont les activités augmentent pour compenser le faible rendement de production d'ATP de ces voies métaboliques. La réduction du pyruvate en lactate devient alors la voie principale de réoxydation du NADH, formé au niveau de la glycolyse. Ainsi, malgré la présence de fer dans le milieu de culture, les résultats obtenus avec la souche *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta entE$ sont en accord avec ce qui est décrit pour *E. coli* en condition de forte limitation en fer, l'absence de sidérophore mimant une carence en fer.

De la même manière qu'avec la souche sauvage, la souche mutante $\Delta entE$ a été cultivée en présence des acides aminés branchés (leucine, valine et isoleucine) dans un milieu de culture à 10 μ M (**Figure 48**).

Comme le montrent ces graphiques, l'ajout des acides aminés conduit à réduire considérablement l'accumulation du DHIV, du DHMP et du 2-IPM puisque ces métabolites ne sont plus détectables dans les surnageants. De plus, cet ajout permet de restaurer en partie le taux de croissance de la bactérie qui est de 0.35 h⁻¹ en présence des acides aminés contre 0.22 h⁻¹ en leur absence. Ceci confirme une fois de plus que la production de ces métabolites est associée très significativement à des perturbations au niveau de la voie des acides aminés branchés, mais aussi que la voie des BCAA est l'une des premières voies à être impactée par la disponibilité extracellulaire en fer.

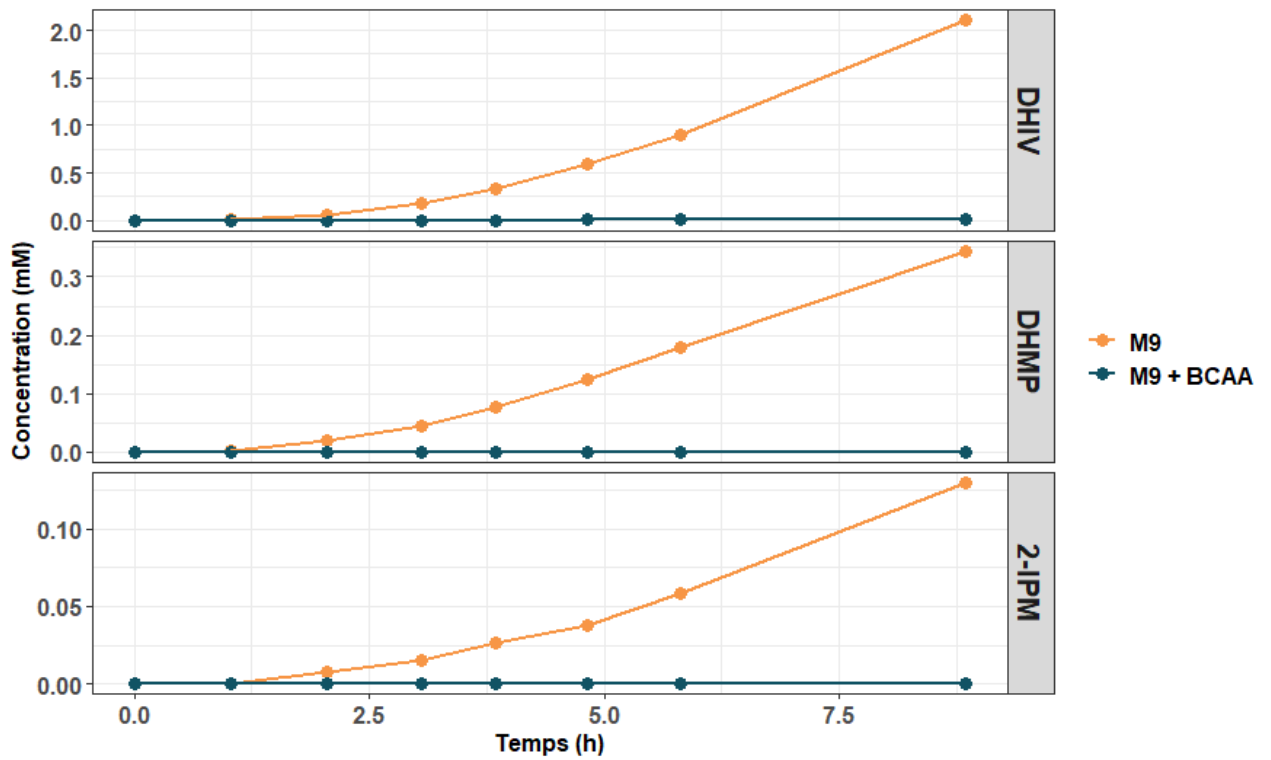


Figure 48: Suivi de culture d'*E. coli* K-12 MG1655 $\Delta entE$ en milieu minimum M9 en présence ou en absence de valine, leucine et isoleucine.

- **Quantification des sidérophores produits lors d'un excès en fer**

Les résultats des expériences précédentes suggèrent que la souche *E. coli* K-12 MG1655 produit significativement des sidérophores et ceci, même en présence de fortes concentrations en Fe^{3+} . Cette observation apparaît contradictoire avec ce qui rapporté dans la littérature (Neilands 1995) dans la mesure où le déclenchement de la production des sidérophores est considéré comme associé à une limitation ou à une carence en fer (Neilands 1995, Watts *et al.* 2012). Dans un tel cas, le comportement de croissance de la souche sauvage et celui de la souche mutante ΔentE aurait donc dû être similaire lorsque la concentration en Fe^{3+} est élevée dans le milieu de culture. Pour s'assurer que la souche sauvage produit effectivement des sidérophores en milieu minimum riche en fer, ces chélatants ont été quantifiés en duplicat dans les surnageants de culture de la souche sauvage *E. coli* K-12 MG1655 et dans ceux de la souche *E. coli* K-12 MG1655 ΔentE . Il est à noter que ce dosage n'est pas spécifique de l'entérobactine mais conduit à titrer tout agent chélatant présent dans un échantillon.

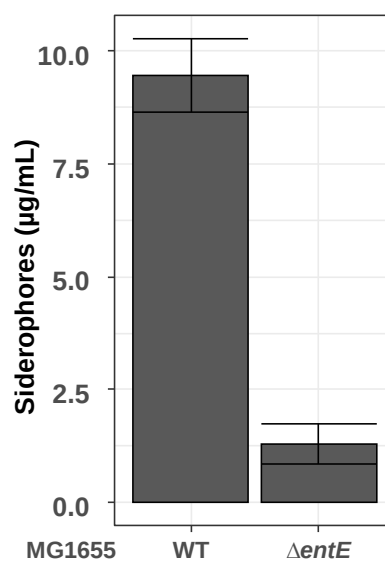


Figure 49: Dosage des sidérophores produits en condition non limitante en fer (100 μM) par la souche *E. coli* MG1655 WT mais aussi par un mutant de leur synthèse.

Les résultats présentés **Figure 49** confirment clairement que la souche sauvage, en présence de forte concentration en fer, produit des sidérophores de manière conséquente (9,47 µg/mL), alors que ceux-ci sont faiblement détectés dans les surnageants de la souche *E. coli* K-12 MG1655 $\Delta entE$ (1,29 µg/mL).

- **Importance de l'assimilation du fer ferreux**

Comme indiqué dans l'introduction, il existe plusieurs processus pour assimiler le fer. L'un d'eux permet d'internaliser des ions Fe^{2+} sans complexation avec des agents chélatants, tels que les sidérophores. Dans les milieux de culture minimum utilisés dans ce travail, le fer n'est apporté que sous forme d'ions ferriques Fe^{3+} . Or, le fer peut être apporté à la bactérie aussi sous forme ferreuse (Fe^{2+}) ou en mélange d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} (Andrews *et al.* 2003, Porcheron *et al.* 2013). En solution aqueuse à pH physiologique (6 – 7) et saturée en oxygène, l'oxydation abiotique de l'ion ferreux en ion ferrique se déroule. Ces conditions physico-chimiques sont proches de celles rencontrées au cours de la culture. Néanmoins, une caractérisation de la croissance d'*E. coli* a été réalisée dans des milieux pour lesquels la source de fer a été remplacée partiellement (mélange $FeCl_3/FeSO_4$) ou complètement par du $FeSO_4$. Les cultures ont été réalisées comme précédemment, avec la souche sauvage et la souche mutante $\Delta entE$, en présence de différentes quantités de fer dans le milieu de culture. Comme attendu, la substitution de l'ion ferrique totale ou partielle par l'ion ferreux a eu aucun effet significatif sur la croissance ou sur le profil de produits excrétés (résultats non présentés). En particulier, on observe la même accumulation de DHIV, DHMP et de 2-IPM pour la souche $\Delta entE$ par rapport à la condition en présence d'ions Fe^{3+} , ce qui suggère effectivement que les ions ferreux sont totalement oxydés en ions

ferriques dans nos conditions de culture, et que seuls les transports utilisant les sidérophores sont actifs.

En résumé, ces résultats mettent en évidence que la disponibilité en fer dans l'environnement impacte le fonctionnement de la voie métabolique de biosynthèse des acides aminés branchés de la bactéries *E. coli* K-12 MG11655, au niveau des deux enzymes Fe-S de cette voie, en raison vraisemblablement d'un défaut de maturation des complexes [Fe-S] de ces enzymes.

5.5. Etude de souches *E. coli* B2 commensales

Afin d'évaluer si les résultats obtenus précédemment sont génériques chez *E. coli* et en particulier chez des souches colonisant le tractus intestinal de l'Homme, l'étude a été étendue à deux souches d'*E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2, la souche Nissle 1917 et SE15. Ce groupe phylogénétique rassemble la plupart des souches d'*E. coli* pathogènes, et devient prévalent dans les pays occidentaux (Tenaillon *et al.* 2010). Comme expliqué en introduction, le fer est un oligoélément crucial pour la croissance de microorganismes tel que *E. coli*. Son assimilation est donc un facteur clef dans la colonisation et la persistance dans des environnements comme l'intestin. Il est également un facteur de déclenchement de la virulence chez certaines bactéries (Deriu *et al.* 2013). Récemment, une équipe du *Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan* dirigée par le Pr. Eric Oswald a mis en évidence un lien direct entre la production de colibactine (génotoxines) et les sidérophores chez des bactéries appartenant à ce groupe phylogénétique (Martin *et al.* 2013), démontrant le rôle crucial que peut jouer le fer dans l'expression de la virulence. Ces souches d'*E. coli* ont pour la plupart des capacités accrues pour capter le fer car elles sont susceptibles d'utiliser un arsenal plus conséquent de sidérophores qu'*E. coli* K-

12 MG1655. Dans cette étude, les deux bactéries choisies sont non pathogènes mais sont susceptibles de synthétiser plusieurs sidérophores. La souche ECN possède l'éventail complet qui inclut l'entérobactine, la salmocheline, la yersiniabactine et l'aerobactine (Grozdanov *et al.* 2004), la souche SE15 pouvant synthétiser l'entérobactine et la yersiniabactine. Ces multiples sidérophores permettent à ces bactéries de capter le fer dans des conditions environnementales changeantes (Valdebenito *et al.* 2006). Des souches mutées dans leur capacité à produire des sidérophores ont été également utilisées dans cette étude. La souche SE15 $\Delta entD$ n'est plus capable de synthétiser ces agents chélatants. Chez ECN, la suppression de la production de sidérophore nécessite une double délétion des gènes *entD* et *clbA*. En effet, chez cette souche, *clbA* est un gène qui est porté sur l'îlot de pathogénicité codant entre autres chose, pour les enzymes de synthèse de la colibactine et peut se substituer fonctionnellement à *entD* pour la synthèse des sidérophores (Martin *et al.* 2013). Grâce à cette double délétion, la synthèse des sidérophores chez ECN est réduite à celle d'aerobactine qui, dans la littérature, n'est pas fonctionnelle à pH7 mais à pH acide (Valdebenito *et al.* 2006). Aussi, dans nos conditions, la souche ECN $\Delta entD \Delta clbA$ est en théorie dépourvue de sidérophore fonctionnel.

- **Suivi de croissance d'ECN et d'ECN $\Delta entD \Delta clbA$**

Dans un premier temps, un suivi de croissance de ces souches a été réalisé en présence de différentes concentrations en Fe^{3+} (de 0,05 à 1000 μM), correspondant aux conditions testées avec la souche *E. coli* K-12 MG 1655.

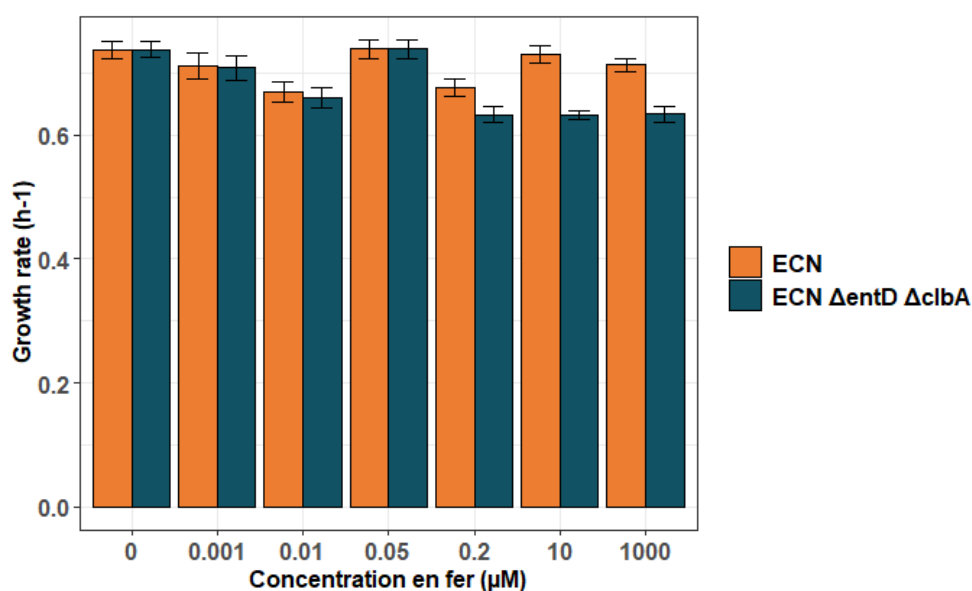


Figure 50: Taux de croissance à différentes concentrations en Fe^{3+} pour *E. coli* B2 Nissle 1917 et *E. coli* B2 Nissle 1917 $\Delta entD \Delta clbA$.

La **Figure 50** présente les taux de croissance de souche ECN et de son variant génétique $\Delta entD \Delta clbA$, pour les différentes concentrations en Fe^{3+} testées. Le taux de croissance de la souche ECN est significativement plus élevé que celui de la souche K-12 MG1655 pour des conditions de croissance identiques ($\mu=0,74 \text{ h}^{-1}$ et $\mu=0,56 \text{ h}^{-1}$ respectivement). De plus, le taux de croissance est similaire quelle que soit la concentration en Fe^{3+} initialement présente dans le milieu alors que pour la souche de laboratoire, une baisse du taux de croissance de 30% est observée lorsque la concentration en Fe^{3+} est inférieure à 0,2 μM . D'autre part, l'absence de sidérophore n'a pas d'effet significatif sur le taux de croissance de ces souches, indiquant que le fer n'est pas limitant dans ces conditions, l'absence de limitation en fer expliquant

pourquoi le taux de croissance n'est pas diminué lorsque la concentration en fer est fortement réduite. La gamme de sensibilité au fer de ces *E. coli* B2 apparaît donc significativement différente de celle de la souche *E. coli* K-12 MG1655. Aussi, de nouvelles cultures des souches ECN ont été réalisées en réduisant encore plus la concentration en Fe^{3+} (1nM et 10 nM) initialement présente dans le milieu de culture. Néanmoins, aucun effet significatif sur la croissance n'est observé dans ces conditions.

- **Analyse des surnageants de cultures**

Les surnageants de culture de ces deux souches ont également été analysés par RMN. La **Figure 51** présente les flux de production du DHIV, du DHMP et du 2-IPM au cours de cultures d'ECN et d'ECN $\Delta\text{entD } \Delta\text{clbA}$.

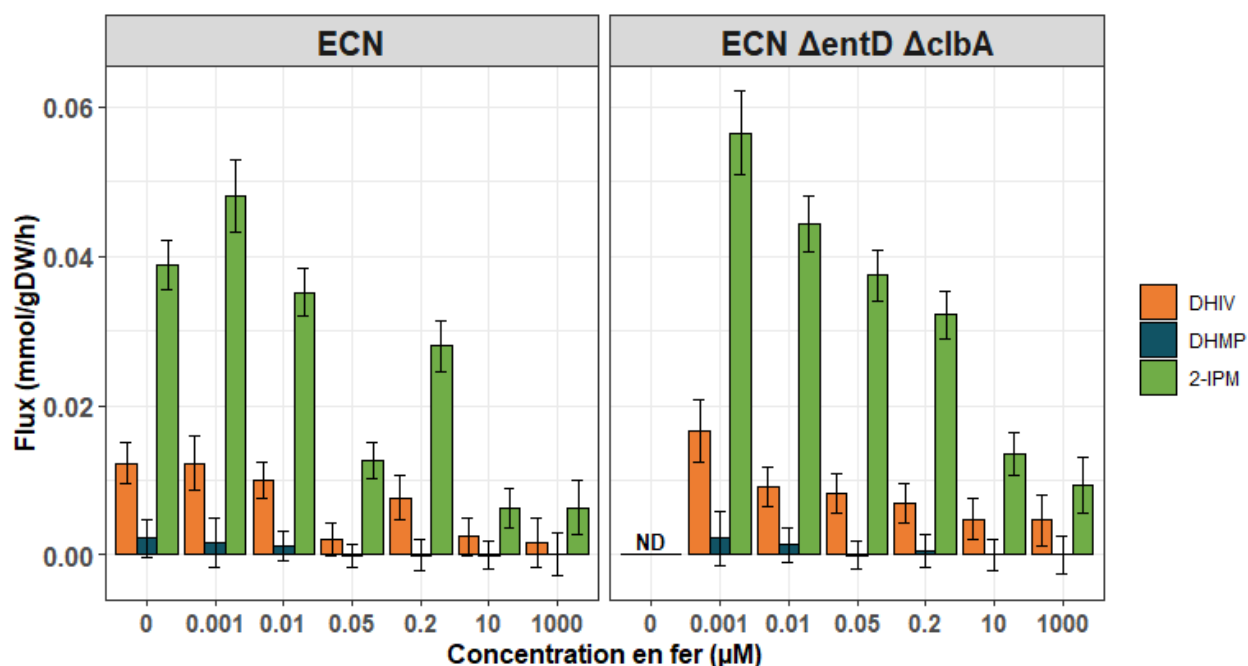


Figure 51: Quantification des métabolites de la voie des BCAA chez *E. coli* B2 Nissle 1917 et *E. coli* B2 Nissle 1917 $\Delta\text{entD } \Delta\text{clbA}$ pour différentes concentrations en Fe^{3+} . ND : Non Déterminé

Contrairement à *E. coli* K-12 MG1655, parmi les 3 intermédiaires de la voie des acides aminés branchés, le composé majoritairement retrouvé dans les surnageants de ces souches est le 2-IPM. Son accumulation est proche de celle observée chez *E. coli* K-12 MG1655 ($0,04 \text{ mmol.gCDW}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et tend à diminuer pour de fortes concentrations en Fe^{3+} dans le milieu de culture. Chez ECN, le flux d'exportation du DHIV tend également à augmenter au fur et à mesure que la concentration en Fe^{3+} diminue. Ainsi, il passe de $0,002 \text{ mmol.gCDW}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à $0,012 \text{ mmol.gCDW}^{-1}.\text{h}^{-1}$, et la concentration maximale mesurée au cours de ces cultures est de $28 \mu\text{M}$. Cette accumulation reste cependant relativement faible comparativement à celle calculée au cours des cultures d'*E. coli* K-12 MG1655, puisque le rapport des flux net de DHIV est de 75 entre les 2 souches pour de faibles concentrations en Fe^{3+} . La concentration du DHMP est, elle, proche du seuil de détection de la méthode utilisée (rapport S/N = 11,3, correspond à une concentration en DHMP de $3\mu\text{M}$). La quantification du DHMP n'est donc réalisable que dans les surnageants de culture correspondant aux plus faibles concentrations en Fe^{3+} .

Enfin, le profil d'accumulation des intermédiaires de la voie des acides aminés branchés de la souche ECN $\Delta\text{entD } \Delta\text{clbA}$ est proche de celui observé pour la souche sauvage. La délétion de ces gènes, et donc de la capacité à synthétiser les sidérophores chez ECN, n'a pas d'effet significatif sur l'accumulation de ces métabolites.

Ces résultats montrent donc que la faible disponibilité en fer provoque aussi chez ces souches d'*E. coli*, une excrétion d'intermédiaires de la voie des BCAA. Les flux d'accumulation de ces métabolites sont nettement plus réduits en comparaison à ceux calculés pour la souche *E. coli* K-12 MG1655. Pour rappel, dans cette souche, la mutation de type « frameshift » dans le gène *ilvG* de l'opéron *ilvGMEDA*, conduit à

une diminution de l'activité spécifique de la DAD (**Chapitre 4**), qui est alors limitante même en présence de fer.. Par ailleurs, bien que la diminution de la concentration en Fe^{3+} dans le milieu de culture perturbe le métabolisme central au niveau de la voie des BCAA, celle-ci n'a pas d'effet sur le taux de croissance de ces souches suggérant que les cellules s'adaptent aux conditions de culture qu'elles rencontrent. Enfin, le fait que la souche ECN ΔentD ΔclbA présente un phénotype de croissance et des profils d'accumulation de métabolites similaires à ceux de la souche sauvage, suggèrent que les sidérophores ont une implication minime dans nos conditions. Conformément, le dosage des sidérophores en conditions non limitantes en Fe^{3+} montre clairement que les sidérophores ne sont pas excrétés par ces souches dans ces conditions, contrairement au cas de la souche *E. coli* K-12 MG1655 (**Figure 52**).

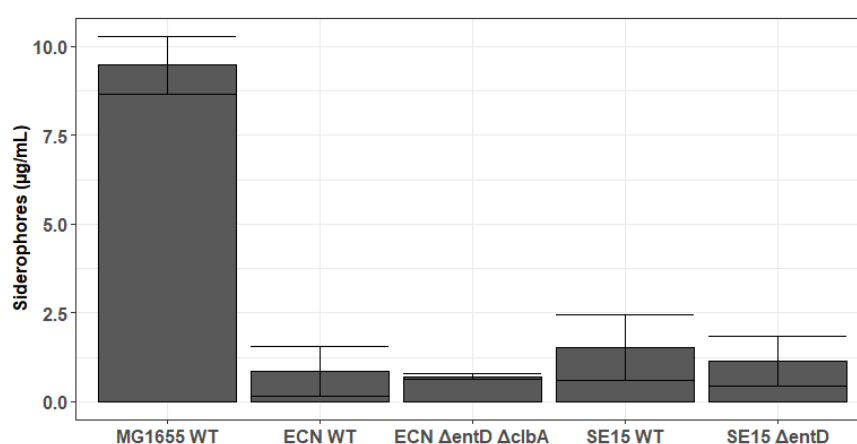


Figure 52: Dosage des sidérophores produits en condition non limitante en fer (100 μM) pour la souche *E. coli* MG1655 ainsi que les souches commensales ECN et SE15.

- **Analyse de la souche commensale *E. coli* SE15.**

Le taux de croissance de la souche *E. coli* SE15 a également été déterminé. Celui-ci est plus élevé que celui de la souche d'*E. coli* K-12 MG1655 et proche de celui

de la souche d'ECN ($0,75 \text{ h}^{-1}$ versus $0,73 \text{ h}^{-1}$ respectivement). De plus, la diminution de la concentration en Fe^{3+} dans le milieu n'a pas d'effet significatif sur le taux de croissance. La mutation des sidérophores n'affecte pas non plus la croissance de ces souches, indiquant qu'ils ne sont pas nécessaires au développement de la cellule. Ces résultats sont appuyés par le dosage des sidérophores produit chez SE15 et SE15 ΔentD (**Figure 52**), qui met en évidence une très faible quantité de chélatants présents lors de croissance en conditions non limitantes en comparaison avec la souche MG1655 WT.

Enfin, dans le milieu de culture, le DHIV et le 2-IPM sont également détectés ($3 \mu\text{M}$ et $6 \mu\text{M}$ respectivement). L'absence de DHMP est vraisemblablement due à une accumulation de ce métabolite inférieure au seuil de détection. Le métabolite majoritaire retrouvé dans les surnageants des souches SE15 est le 2-IPM, tout comme cela est le cas pour la souche ECN. L'excrétion de cet intermédiaire de la voie des BCAA s'avère donc particulièrement associée aux limitations en fer. Ainsi, en conditions de fortes carences, le flux d'accumulation de 2-IPM est de $0,02 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$ soit 2 fois inférieur à celui calculé pour la souche ECN WT, et équivalent à celui calculé pour la souche *E. coli* K-12 MG1655. Le flux d'accumulation de DHIV suit un profil identique à celui du 2-IPM, bien que nettement inférieur $0,007 \text{ mmol.g}_{\text{CDW}}.\text{h}^{-1}$. Les flux d'accumulation de ces métabolites sont très similaires chez la souche SE15 ΔentD .

5.6. Discussion.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact du métabolisme du fer sur le fonctionnement du métabolisme carboné central. Les

résultats ont montré tout particulièrement, qu'il existe un lien métabolique étroit entre la disponibilité en fer et le fonctionnement de la voie de biosynthèse des BCAA.

En effet, au cours de cultures en limitation en fer, la souche *E. coli* K-12 MG1655 accumule du DHIV, du DHMP et, dans des proportions plus faibles, du 2-IPM. L'accumulation de ces intermédiaires de la voie des BCAA est significativement réduite lorsque la concentration en fer⁺ est plus élevée ($\geq 10\mu\text{M}$). Ces intermédiaires sont respectivement les substrats de deux enzymes à centre Fe-S, la DAD pour ce qui concerne le DHIV et le DHMP, et la 2-IPM synthase pour ce qui concerne le 2-IPM. L'accumulation de ces métabolites suggère donc un défaut de maturation des complexes [Fe-S] de ces enzymes. En condition de forte limitation en fer, ce qui est particulièrement le cas pour la souche ΔentE , la transition d'un métabolisme respiratoire vers un métabolisme fermentaire caractérisé par l'augmentation de la production d'acétate, d'éthanol et de lactate est observée. Ce phénomène, rapporté par (Folsom *et al.* 2014), s'explique par le fait que la chaîne respiratoire n'est que partiellement fonctionnelle en raison du défaut de maturation des nombreuses protéines Fe-S impliquées dans le transfert d'électrons. Ces résultats démontrent que le métabolisme aérobie/anaérobie d'*E. coli* K-12 MG 1655 est contrôlé par la disponibilité en fer dans l'environnement de la bactérie.

Le fonctionnement de la voie des BCAA des *E. coli* appartenant au groupe phylogénétique B2 (ECN et *E. coli* SE15) apparaît beaucoup plus robuste face à des limitations en fer. En effet, des variations extracellulaires en fer n'engendrent pas, comme pour la souche *E. coli* K-12 MG1655, des diminutions du taux de croissance. Néanmoins, la présence des intermédiaires de la voie des BCAA dans le milieu de culture indique que la limitation en fer n'est pas sans conséquence sur le fonctionnement de cette voie chez ces souches, et renforce l'idée que cette voie est

l'une des plus sensibles du métabolisme central (bien avant la chaîne respiratoire notamment) à la carence en fer chez *E. coli*. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer l'absence d'un défaut de croissance chez les *E. coli* du groupe B2, est l'existence d'importante réserve intracellulaire, sous forme de fer Fe^{2+} . Pour tenter de valider au moins partiellement cette hypothèse, des expériences préliminaires ont été réalisées consistant à augmenter le nombre de générations pour appauvrir les cellules en fer intracellulaire. Ainsi, des cultures d'ECN sur un milieu contenant 10 nM de Fe^{3+} ont été réalisées et le nombre de générations a pu être augmenté en repiquant en fin de culture les cellules sur le même milieu. Les résultats montrent que le taux de croissance de la souche ECN et son variant $\Delta entD \Delta clbA$ n'est pas affecté durant 8 générations. Cependant, les données RMN montrent qu'au bout de 8 générations, le flux d'accumulation de DHIV chez la souche ECN $\Delta entD \Delta clbA$ est doublé par rapport à celui de la souche sauvage. Néanmoins, pour être plus probant, il conviendrait de diminuer les capacités de stockage de fer avec des mutants délétés du gène codant pour la ferritine (*fthA*) (Abdul-Tehrani *et al.* 1999), d'appauvrir au préalable des réserves internes durant les précultures, et de réaliser des cultures continues de type « chemostats »

Par ailleurs, la production de sidérophores est très significative chez la souche *E. coli* K-12 MG1655 bien que la concentration en fer soit élevée. Or le déclenchement de leur production est considéré comme associé à une limitation ou à une carence en fer (Neilands 1995, Watts *et al.* 2012). Ce résultat surprenant est toutefois cohérent avec les flux d'accumulation des métabolites de la voie de BCAA suggérant en effet que le fer est limitant dans ces conditions. Comparée aux souches B2, *E. coli* MG1655 produit en condition *a priori* non carencée, une quantité non négligeable de sidérophores, suggérant que cette bactérie est continuellement dans un état de stress

vis-à-vis du fer. Ce stress peut avoir diverses conséquences sur son métabolisme est donc sa physiologie.

6. Conclusion et perspectives

6.1. Conclusions

- **Développement RMN pour l'analyse fonctionnelle des réseaux métaboliques.**

La métabolomique, tout comme la fluxomique, nécessitent l'acquisition de grands jeux de données. Ces informations sont obtenues grâce à la complémentarité de la spectroscopie de masse (MS) et de la résonance magnétique nucléaire (RMN). L'analyse fine du métabolome d'un organisme repose sans contexte sur leur correcte association. Pour illustrer cette complémentarité, la MS est plus sensible que la RMN alors que cette dernière est non dégradative ce qui permet de conserver les échantillons et de les analyser éventuellement plus finement. La première permet d'obtenir des informations quantitatives sur l'incorporation du nombre d'isotope dans les métabolites sans que leur position dans la molécule ne soit facilement accessible, alors que la seconde informe sur la position de ces marquages sans *a contrario*, indiquer le nombre d'isotopes incorporés dans le métabolite.

Une partie de cette thèse a été consacrée à la mise au point d'une analyse RMN plus résolutive permettant de séparer avec un important gain de temps des signaux superposés. La voie des BCAA étant déjà bien décrite dans la littérature, et a constitué un support expérimental pertinent pour le développement de cette méthode.

L'une des grandes limitations de la RMN en biologie est la complexité spectrale de l'analyse des milieux organiques. Contrairement à la MS qui peut être couplée à de la chromatographie pour séparer les différents composés présents dans un mélange, notamment l'HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), la RMN est

utilisée en mélange complexe sur des échantillons de milieu de culture de micro-organismes par exemple. Les molécules de ces milieux complexes vont générer au cours de l'analyse des quantités importantes de signaux sur une largeur spectrale étroite (10 ppm en 1D- ^1H). Ainsi une partie des signaux vont se recouper voire se superposer ce qui engendre des difficultés, à la fois pour l'identification mais aussi pour la quantification des métabolites. Pour remédier à ce problème une séquence dite « Pure shift » a été combinée à une analyse de type « 2D J-resolved ». Le résultat est une pseudo 3D. Le spectre ainsi obtenu permet d'une part d'avoir une séparation dans l'espace (2D) les différents signaux sans avoir de recouvrement. D'autre part, chaque signal comporte de manière orthogonale l'information chimique de ses couplages ^1H – ^{13}C . Ainsi les spectres acquis sont grandement simplifiés ce qui facilite et améliore la quantification des isotopomères en mélange complexe.

Les analyses « pure shift 2D J-resolved », sont des séquences d'acquisition relativement longue qui nécessite un temps d'analyse de l'ordre de la dizaine d'heures par échantillon. L'élucidation de nouvelles voies métaboliques basées sur la fluxomique nécessite de produire une grande quantité d'échantillons. Pour permettre un équilibre entre le débit d'analyse et la simplification des spectres RMN, la procédure a été optimisée. Le couplage l'utilisation de deutérium (^2H) et une acquisition « Pure shift » a permis ainsi de réduire le temps d'analyse de 10h à 5min. Il est maintenant possible, suivant la topologie du réseau, d'analyser rapidement des séries conséquentes d'échantillons.

- **Métabolisme de l'acétate au cours de la consommation de glucose**

Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent qu'*E. coli* peut consommer simultanément de l'acétate et du glucose lors d'une croissance exponentielle sur un

excès de glucose, contrairement à ce qui est généralement considéré pour ce microorganisme. Cette consommation d'acétate est assurée par la voie Pta-AckA. Bien que connue pour être réversible, cette dernière voie est généralement considérée fonctionnant uniquement dans le sens de la production d'acétate. Nos données montrent que la voie Pta-AckA seule peut soutenir à la fois la production et la consommation d'acétate en cas d'excès de glucose. Par une approche de marquage isotopique, les deux flux unidirectionnels, sens de formation ou sens de consommation de l'acétate, ont été mesurés individuellement. La résultante est l'équilibre entre ces deux processus opposés, conduisant à production nette ou consommation nette d'acétate. Le sens de fonctionnement de la voie Pta-AckA lors d'un excès de glucose, c'est-à-dire la production nette ou l'utilisation nette d'acétate, est contrôlée thermodynamiquement et est essentiellement déterminée par la concentration extracellulaire de cet acide organique. Par une approche de modélisation cinétique de la voie Pta-AckA, il a été estimé que l'acétate est produit lorsque sa concentration externe est inférieure à une valeur seuil de 8 mM. Au-dessus de cette valeur seuil, l'acétate est consommé.

Les mécanismes de contrôle des deux voies principales du métabolisme de l'acétate chez *E. coli*, à savoir les voies Pta-AckA et Acs, sont donc très différents. Acs est contrôlé par la répression catabolique, qui est un processus de régulation actif. La voie Pta-AckA est contrôlée thermodynamiquement - c'est-à-dire un processus passif - qui peut avoir divers avantages. Premièrement, les flux unidirectionnels de production et d'utilisation de l'acétate sont instantanément adaptés à la concentration externe d'acétate. Cela permet un réglage fin du métabolisme de l'acétate en fonction de sa disponibilité. De plus, il permet au métabolisme de passer rapidement de la dissimilation de l'acétate à l'assimilation de l'acétate au cours de la croissance

glycolytique, par exemple en réponse à une augmentation soudaine de la disponibilité de l'acétate, ce qui permet un temps de réponse bien plus faible que celui nécessaire à l'expression fonctionnelle de nouvelles enzymes par régulation hiérarchique (*i.e.* Acs).

Ainsi, le métabolisme de l'acétate chez *E. coli* est contrôlé dans une large mesure par l'environnement via le contrôle thermodynamique de la voie Pta-AckA. Ce contrôle permet à la bactérie de consommer de l'acétate même dans des conditions d'excès de glucose, à condition que la concentration externe en acétate soit suffisamment élevée. Cela contraste avec la considération générale selon laquelle l'acétate ne peut être consommé qu'après épuisement des sources de carbone glycolytique. Le mode d'utilisation des substrats glycolytiques et de l'acétate par *E. coli* peut alors être séquentiel ou concomitant selon la disponibilité de l'acétate. En laboratoire, la croissance d'*E. coli* sur le glucose est généralement effectuée dans des conditions conduisant à une faible accumulation d'acétate dans le milieu extérieur. Dans de telles conditions, la thermodynamique de la voie Pta-AckA favorise la production d'acétate. Contrairement aux conditions de laboratoire, la concentration d'acétate dans l'intestin est élevée (entre 30 et 100 mM (Argenzio *et al.* 1974, Cummings and Englyst 1987, Macfarlane *et al.* 1992)), bien au-dessus du seuil de 8 mM. Du point de vue thermodynamique, de tels niveaux d'acétate favorisent la consommation nette de ce composé dans l'intestin. Il est donc très probable qu'*E. coli* co-consomme de l'acétate avec des sucres dans l'intestin, contrairement à ce qui est actuellement supposé (Fabich *et al.* 2008).

- **Effet de la mutation frameshift *ilvG* sur le métabolisme d'*E. coli* K-12.**

E. coli K-12 MG1655 est une bactérie « modèle » dans les laboratoires de recherches. Elle fait partie des premiers organismes à avoir été entièrement séquencés (Blattner *et al.* 1997). Une des caractéristiques du groupe phylogénétique K-12 est de posséder en son génome, une mutation de type « frameshift » (décalage du cadre de lecture) sur le gène *ilvG* (Lawther *et al.* 1982) qui a pour conséquence d'engendrer une sensibilité de croissance à la valine (De Felice *et al.* 1979, Favre *et al.* 1976).

Un des objectifs de cette thèse était de comprendre les conséquences métaboliques de cette mutation. Après comparaison de surnageants de culture entre une souche sauvage et une souche sans cette mutation, il s'avère que trois métabolites s'accumulent spécifiquement dans les surnageants de culture des *E. coli* K-12. Il s'agit du 2,3-dihydroxy-isovalérate (DHIV), du 2,3-dihydroxy-3-methylpentanoate (DHMP) et du propionate. La présence de DHIV et de DHMP dans le milieu extracellulaire est la conséquence directe de la mutation du gène *ilvG*. Après investigation, il a pu être mis en évidence que l'activité spécifique de la DAD est nettement réduite chez les bactéries portant la mutation « frameshift ». Cette diminution de l'activité n'est pas la conséquence d'une moins bonne expression de ce gène, ainsi que l'atteste les mesures en qPCR de l'expression des gènes de l'opéron, mais d'un défaut dans la traduction de l'ARN (décrochage des ribosomes) ou dans la modification post-traductionnelle de l'enzyme, qui conduit à une baisse de son activité spécifique *in vivo*.

L'élucidation du processus métabolique de formation de propionate a été un volet très important de la thèse. En effet, les études approfondies menées sur ce volet ont permis de démontrer que les AHAS peuvent catalyser la décarboxylation du 2-

ketobutyrate en propionate. Cette réaction met en évidence le caractère promiscuitaire de cette enzymatique (promiscuité réactionnelle) qui a des conséquences importantes sur le métabolisme de la bactérie. En effet, les analyses *in silico* montrent l'importance de la formation de propionate par l'AHAS par le mécanisme promiscuitaire pour maintenir la fonction métabolique de la voie des BCAA en contribuant à sa régulation, au même titre que le mécanisme de rétrocontrôle, de manière plus marquée. Ce mécanisme de promiscuité enzymatique est donc loin d'être anecdotique et au contraire, se révèle central pour le maintien de la robustesse métabolique de la voie des BCAA.

- **Le 2-ketobutyrate : un métabolite clef dans la régulation de la voie des BCAA.**

La formation de l'isoleucine dépend intégralement de la capacité d'*E. coli* à former au préalable du 2-ketobutyrate. De plus, il s'agit aussi finalement du précurseur pour la synthèse de propionate par les AHAS.



246

traduit notamment par l'accumulation de KBU (LaRossa *et al.* 1987). Beaucoup d'hypothèses ont été évoquées dans la littérature pour expliquer pourquoi cette molécule induit un arrêt de croissance d'*E. coli*, de *Salmonella typhimurium* et d'autres bactéries. On peut citer notamment un impact sur la biosynthèse de l'aspartate (Daniel *et al.* 1983, Van Dyk and LaRossa 1986), sur le système de transport PTS (phosphotransferase system) (Daniel *et al.* 1983), sur la biosynthèse du pantothénate (Primerano and Burns 1982) ou sur la synthèse de l'acyl-CoA (Danchin *et al.* 1984, Primerano and Burns 1982). Le KBU est aussi défini comme une alarmone impliquée dans la transition métabolique anaérobie/aérobie (Daniel *et al.* 1983). Finalement, nos résultats corroborent avec l'interprétation donnée par (Shaw and Berg 1980), expliquant l'effet toxique de ces agents herbicides sur la synthèse de la valine et de la leucine.

- **L'activité des enzymes [Fe-S] de la voie des BCCA est étroitement liée à la disponibilité en fer.**

Le fer est indispensable au fonctionnement du métabolisme central carboné. Il est notamment un constituant essentiel des protéines à centre [Fe-S] (Andrews *et al.* 2003). Durant cette thèse, des analyses de la croissance et du métabolisme d'*E. coli* cultivée sur des milieux dont la disponibilité en fer est réduite fortement, ont été réalisées. De manière très intéressante, la diminution de la disponibilité en fer a des répercussions directes sur le fonctionnement du métabolisme carboné de la bactérie. En effet, des intermédiaires de la voie des BCAA s'accumulent dans le milieu de culture des cellules et plus précisément, le DHIV, le DHMP et le 2-IPM. Ces métabolites sont les substrats des deux enzymes à centre [Fe-S] de la voie, à savoir la DAD et l'IPMI, deux enzymes décrites pour être très sensibles à la présence

d'oxygène (Brown *et al.* 1995, Jang and Imlay 2007, Kuo *et al.* 1987). Les résultats obtenus au cours des travaux de thèse indiquent que ces enzymes sont très sensibles à la disponibilité en fer et les premières à subir les conséquences de cette faible disponibilité sur la maturation des complexes [Fe-S].

- **Toutes les souches d'*E. coli* ne sont pas égales vis-à-vis de la disponibilité en fer.**

Comme expliqué précédemment, la clade *E. coli* est relativement disparate. Majoritairement, ces bactéries sont commensales et interagissent positivement avec leur environnement. Ces bactéries, appartenant essentiellement pour la plupart au groupe phylogénétique B2, ont acquis du matériel génétique par transfert horizontal (éventuellement des îlots de pathogénicités) (Lesic and Carniel 2005, Ochman *et al.* 2000). Ce matériel génétique supplémentaire leur octroie des capacités d'adaptations souvent meilleures que celles des bactéries étudiées au laboratoire.

Durant cette thèse, deux souches (ECN et SE15) du groupe phylogénétique B2 ont été étudiées et comparées à la souche de laboratoire *E. coli* K-12 MG1655. Le premier constat est la confirmation que l'IPMI est très sensible aux limitations en fer. Cette enzyme, présente dans la voie de synthèse de la leucine, s'avère également très sensible à la disponibilité en fer chez ces souches commensales, ce qui lui confère un caractère généralisable l'ensemble des *E. coli*.

Une importante différence entre les souches K-12 et les souches B2 est leur capacité de stockage du fer. En plus de posséder un plus large panel de sidérophores, leur réserves internes sont plus importantes. Les résultats obtenus sur les différentes souches démontrent qu'il est nécessaire de générer deux fois plus de générations chez les souches B2 ECN et SE15 que chez la souche MG1655 avant de constater

des perturbations métaboliques. Cette capacité de stockage représente vraisemblablement un réel atout dans des environnements comme l'intestin pour s'y implanter et le coloniser, octroyant à ces bactéries un avantage compétitif.

- **Régulation et contrôle métabolique dans la voie des BCAA.**

Les questionnements initiaux de la thèse portaient sur l'identification des mécanismes de régulation de la voie des BCAA dans le but d'évaluer sa robustesse vis-à-vis de contrainte environnementale et génétique et sur l'effet de la disponibilité en fer sur le fonctionnement du réseau métabolique.

L'ensemble des résultats obtenus a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur le fonctionnement de la voie des BCAA en particulier et sur les mécanismes de sa régulation. Elle est décrite comme une voie dépendante des concentrations intracellulaires en valine, en leucine et en isoleucine qui contrôlent le flux dans la voie et sa distribution dans les différentes branches conduisant à la synthèse des trois acides aminés. D'autres mécanismes de contrôle métabolique, mis en évidence au cours de la thèse (excrétion du propionate, activité promiscuitaire des AHAS) contribuent également au maintien de l'homéostasie dans cette partie du métabolisme. De manière remarquable, la disponibilité en fer a aussi un effet sur le fonctionnement de cette voie et les travaux ont donc mis en évidence un lien fort entre le métabolisme du fer et la voie des BCAA. Cette connexion se réalise au niveau des deux enzymes à centre [Fe-S]. Lors de limitation en fer, l'activité de ces enzymes est diminuée, et se traduit par l'exception et l'accumulation dans les surnageants de DHIV, DHMP et 2-IPM.

L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse mettent donc en évidence l'importance de cette voie dans la physiologie *E. coli*. Fortement régulées

(promiscuités enzymatiques, excréctions, rétrocontrôles, sensibilité en fer, LRP, réponse stringente), cette voie complexe mais robuste, s'adapte aux différentes contraintes qui lui sont imposées.

6.2. Perspectives

- **Mise en application de la Pure Shift Heteronuclear 2D J-Resolved.**

Dans la voie des BCAA, la toute première étape pour obtenir la synthèse de l'isoleucine est la conversion de la thréonine en KBU, catalysée par la thréonine désaminase codée par le gène *ilvA*. Sa délétion est en effet létale pour la bactérie si elle est cultivée en milieu minimum. Or récemment une équipe de recherche a réussi à restaurer la croissance d'un mutant $\Delta ilvA$ (Smith *et al.* 2015). Ce résultat a été obtenu en exprimant dans la bactérie, un petit peptide synthétique de 102 acides aminés (syn-I3) (Fisher *et al.* 2011). A l'heure actuelle les mécanismes d'action qui conduisent à la restauration du phénotype de croissance restent inconnus. Le peptide peut être un régulateur transcriptionnel (il pourrait induire par exemple TdcE), ou aussi réaliser lui-même la catalyse de la thréonine en KBU, ou bien créer une nouvelle connexion entre la voie des BCAA et le reste du métabolisme.

La nouvelle séquence d'analyse RMN développée au cours de la thèse, autorise des analyses semi haut débit. En conjuguant mutants d'enzymes de la voie de synthèse de l'isoleucine afin de déterminer le niveau d'entrée de la « nouvelle connexion » générée par le peptide et un marquage adapté, il serait donc possible de conclure sur l'action catalytique ou régulatrice de syn-I3 et sa contribution dans la restauration du phénotype de croissance.

- **Application du nouveau modèle de régulation de la voie des BCAA à la production de molécules d'intérêts**

Comme démontré durant le **Chapitre 4**, les mécanismes de régulation de la voie des BCAA sont nombreux, complexes, et complémentaires. *E. coli* est une plateforme microbienne de bioproduction de différentes molécules. La valine fait partie de ces composés synthétisés par voie biotechnologique (Park *et al.* 2011, Park *et al.* 2007). Actuellement, la souche *E. coli* W (ATCC 9637) est communément utilisée car elle offre une meilleure tolérance à l'accumulation de valine. Toutefois l'utilisation d'une souche K-12, qui est totalement maîtrisée au niveau génétique, pourrait apporter de meilleur rendement de production à condition de restaurer le gène *ilvG* et d'ajuster le ratio KBU/Pyr. Cet ajustement sera possible à condition de limiter la concentration intracellulaire en KBU soit *via* l'utilisation d'une thréonine désaminase plus sensible à l'inhibition de son produit (le KBU) soit *via* l'expression d'enzyme permettant sa conversion en propionate.

L'isoleucine est, elle, encore produite par *C. glutamicum*. Chacune des AHAS a une affinité particulière pour le pyruvate et le KBU. Un double mutant $\Delta ilvI \Delta ilvG$ a un ratio KBU/Pyr nettement supérieur à celui d'un simple mutant $\Delta ilvG$. Ce profil favorise la voie de formation de l'isoleucine et par conséquent sa production. Son utilisation pourrait potentiellement, après ajustement, générer des rendements plus élevés.

Enfin, une forte promiscuité enzymatique des AHAS a pu être observée (acétate, acétolactate, acétoine, 2-aceto-2-hydroxybutanoate, propionate). Cette caractéristique offre de nouvelles possibilités de réactions enzymatiques *in vitro* mais également *in vivo*. Ainsi il est envisageable de produire de nouveaux composés à

l'aide de ces enzymes chez *E. coli* sous réserve d'optimiser ces réactions promiscuitaires par ingénierie enzymatique notamment.

- **Induction de la réponse stringente par l'absence de fer.**

Il est établi depuis plusieurs décennies que la carence en acides aminés déclenchent la réponse stringente chez *E. coli* par l'accumulation de (p)ppGpp, synthétisé par l'enzyme RelA (Cashel and Rudd 1996, Haseltine and Block 1973). Plus récemment, il a été montré que des limitations en fer conduisent également au déclenchement de la réponse stringente par la production de (p)ppGpp, non pas par RelA mais par l'enzyme SpoT (Vinella *et al.* 2005). Dans le système métabolique étudié au cours de cette thèse, la carence en fer conduit également à une limitation du flux de production en acides aminés, en l'occurrence celui de production des acides aminés branchés. Aussi, tout naturellement, la question de l'implication de SpoT (carence en fer) ou de RelA (carence en acides aminés) ou des deux en même temps, se pose pour la synthèse de (p)ppGpp (**Figure 54**).

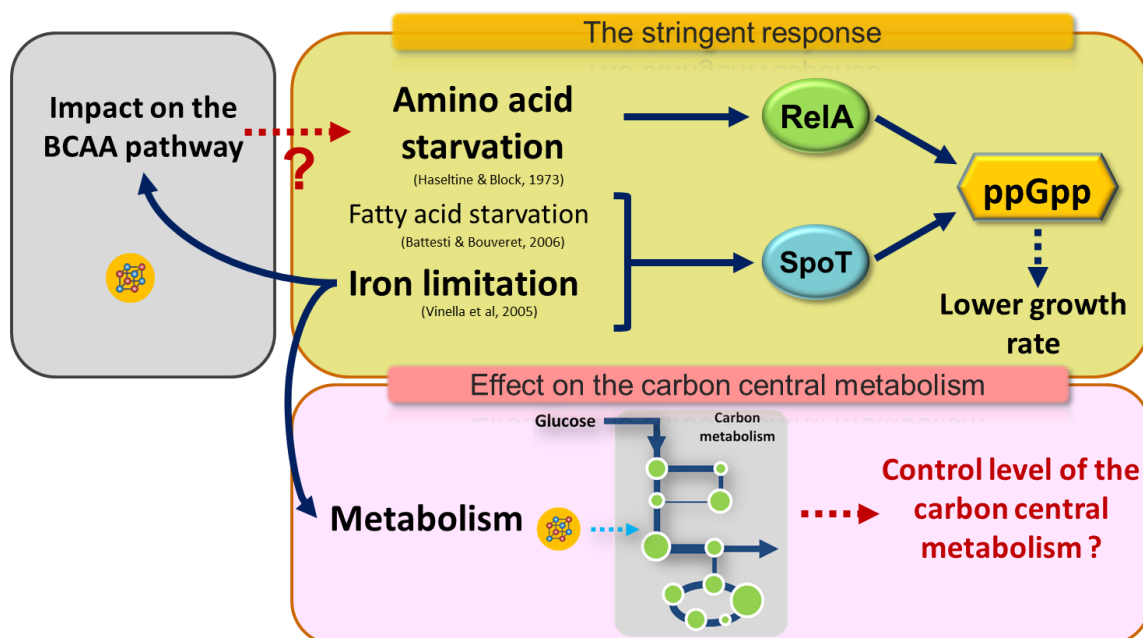


Figure 54: Représentation des liens de régulations qui lient le métabolisme du fer à la voie des BCAA

Durant la thèse, l'attention s'est portée sur la voie des BCAA, du fait de l'impact majeur des carences en fer sur la DAD et l'IPMI. Des analyses préliminaires ont démontré l'importance de RelA lors d'une carence en fer. Cependant ces résultats restent encore à être répliqués. L'utilisation d'une souche mutée partiellement sur la partie synthase de SpoT doit aussi être envisagée. Enfin, les cultures sans fer doivent encore être optimisées afin d'induire une réponse forte de la bactérie face à ce stress. L'ensemble de ces résultats permettra ainsi de confirmer le rôle majeur de RelA dans la réponse à ce stress.

La voie des BCAA est la toute première voie à être visiblement impactée par le manque de fer. Or, il existe des enzymes fer-soufre dans d'autres parties importantes du métabolisme *E. coli*, telle que le cycle de Krebs. Elles peuvent notamment être impliquées dans des processus de transition aérobie/anaérobie, ou bien pour les souches pathogènes, dans l'induction de la virulence (Tronnet *et al.* 2016). Il serait

donc bénéfique d'envisager d'étendre l'étude à l'ensemble des protéines fer-soufre du métabolisme carboné central, ainsi que sur un plus grand éventail de souche *E. coli* afin de mieux comprendre à quel point le métabolisme du fer et le métabolisme carboné son étroitement imbriqués.

Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest and S. C. Andrews (1999). "Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient." *J Bacteriol* **181**(5): 1415-1428.

Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodriguez-Quinones (2003). "Bacterial iron homeostasis." *FEMS Microbiol Rev* **27**(2-3): 215-237.

Argenzio, R. A., M. Southworth and C. E. Stevens (1974). "Sites of organic acid production and absorption in the equine gastrointestinal tract." *Am J Physiol* **226**(5): 1043-1050.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* **277**(5331): 1453-1462.

Brown, O. R., E. Smyk-Randall, B. Draczynska-Lusiak and J. A. Fee (1995). "Dihydroxy-acid dehydratase, a [4Fe-4S] cluster-containing enzyme in *Escherichia coli*: effects of intracellular superoxide dismutase on its inactivation by oxidant stress." *Arch Biochem Biophys* **319**(1): 10-22.

Cashel, M. and K. Rudd (1996). The stringent response. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. **2**: 1410-1438.

Cummings, J. H. and H. N. Englyst (1987). "Fermentation in the human large intestine and the available substrates." *Am J Clin Nutr* **45**(5 Suppl): 1243-1255.

Danchin, A., L. Dondon and J. Daniel (1984). "Metabolic alterations mediated by 2-ketobutyrate in *Escherichia coli* K12." *Mol Gen Genet* **193**(3): 473-478.

Daniel, J., L. Dondon and A. Danchin (1983). "2-Ketobutyrate: a putative alarmone of *Escherichia coli*." *Mol Gen Genet* **190**(3): 452-458.

De Felice, M., M. Levinthal, M. Iaccarino and J. Guardiola (1979). "Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli* K-12." *Microbiol Rev* **43**(1): 42-58.

Deriu, E., J. Z. Liu, M. Pezeshki, R. A. Edwards, R. J. Ochoa, H. Contreras, S. J. Libby, F. C. Fang and M. Raffatellu (2013). "Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron." *Cell Host Microbe* **14**(1): 26-37.

Fabich, A. J., S. A. Jones, F. Z. Chowdhury, A. Cernosek, A. Anderson, D. Smalley, J. W. McHargue, G. A. Hightower, J. T. Smith, S. M. Autieri, M. P. Leatham, J. J. Lins, R. L. Allen, D. C. Laux, P. S. Cohen and T. Conway (2008). "Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine." *Infect Immun* **76**(3): 1143-1152.

Favre, R., A. Wiater, S. Puppo and M. Iaccarino (1976). "Expression of a valine-resistant acetolactate synthase activity mediated by the *ilv O* and *ilv G* genes of *Escherichia coli* K-12." *Mol Gen Genet* **143**(3): 243-252.

Fisher, M. A., K. L. McKinley, L. H. Bradley, S. R. Viola and M. H. Hecht (2011). "De novo designed proteins from a library of artificial sequences function in *Escherichia coli* and enable cell growth." *PLoS One* **6**(1): e15364.

Folsom, J. P., A. E. Parker and R. P. Carlson (2014). "Physiological and proteomic analysis of *Escherichia coli* iron-limited chemostat growth." *J Bacteriol* **196**(15): 2748-2761.

Grozdanov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker and U. Dobrindt (2004). "Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917." *J Bacteriol* **186**(16): 5432-5441.

- Hartmann, A. and V. Braun (1981). "Iron uptake and iron limited growth of *Escherichia coli* K-12." Arch Microbiol **130**(5): 353-356.
- Haseltine, W. A. and R. Block (1973). "Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(5): 1564-1568.
- Jang, S. and J. A. Imlay (2007). "Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes." J Biol Chem **282**(2): 929-937.
- Kuo, C. F., T. Mashino and I. Fridovich (1987). "alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme." J Biol Chem **262**(10): 4724-4727.
- LaRossa, R. A., T. K. Van Dyk and D. R. Smulski (1987). "Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **169**(4): 1372-1378.
- Lawther, R. P., D. H. Calhoun, J. Gray, C. W. Adams, C. A. Hauser and G. W. Hatfield (1982). "DNA sequence fine-structure analysis of *ilvG* (*IlvG*+) mutations of *Escherichia coli* K-12." J Bacteriol **149**(1): 294-298.
- Lesic, B. and E. Carniel (2005). "Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*." J Bacteriol **187**(10): 3352-3358.
- Lonhienne, T., M. D. Garcia, G. Pierens, M. Mobli, A. Nouwens and L. W. Guddat (2018). "Structural insights into the mechanism of inhibition of AHAS by herbicides." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(9): E1945-E1954.
- Macfarlane, G. T., G. R. Gibson and J. H. Cummings (1992). "Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon." J Appl Bacteriol **72**(1): 57-64.
- Macomber, L. and J. A. Imlay (2009). "The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8344-8349.
- Martin, P., I. Marcq, G. Magistro, M. Penary, C. Garcie, D. Payros, M. Boury, M. Olier, J. P. Nougayrede, M. Audebert, C. Chalut, S. Schubert and E. Oswald (2013). "Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli*." PLoS Pathog **9**(7): e1003437.
- Neilands, J. B. (1995). "Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds." J Biol Chem **270**(45): 26723-26726.
- Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.
- Park, J. H., Y. S. Jang, J. W. Lee and S. Y. Lee (2011). "*Escherichia coli* W as a new platform strain for the enhanced production of L-valine by systems metabolic engineering." Biotechnol Bioeng **108**(5): 1140-1147.
- Park, J. H., K. H. Lee, T. Y. Kim and S. Y. Lee (2007). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7797-7802.
- Peiro, C., P. Millard, A. de Simone, E. Cahoreau, L. Peyriga, B. Enjalbert and S. Heux (2019). "Chemical and Metabolic Controls on Dihydroxyacetone Metabolism Lead to Suboptimal Growth of *Escherichia coli*." Appl Environ Microbiol **85**(15).
- Pinu, F. R., N. Granucci, J. Daniell, T. L. Han, S. Carneiro, I. Rocha, J. Nielsen and S. G. Villas-Boas (2018). "Metabolite secretion in microorganisms: the theory of metabolic overflow put to the test." Metabolomics **14**(4): 43.

Porcheron, G., A. Garenaux, J. Proulx, M. Sabri and C. M. Dozois (2013). "Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence." Front Cell Infect Microbiol **3**: 90.

Primerano, D. A. and R. O. Burns (1982). "Metabolic basis for the isoleucine, pantothenate or methionine requirement of ilvG strains of Salmonella typhimurium." J Bacteriol **150**(3): 1202-1211.

Salmon, K., S. P. Hung, K. Mekjian, P. Baldi, G. W. Hatfield and R. P. Gunsalus (2003). "Global gene expression profiling in Escherichia coli K12. The effects of oxygen availability and FNR." J Biol Chem **278**(32): 29837-29855.

Shaw, K. J. and C. M. Berg (1980). "Substrate channeling: alpha-ketobutyrate inhibition of acetohydroxy acid synthase in Salmonella typhimurium." J Bacteriol **143**(3): 1509-1512.

Smith, B. A., A. E. Mularz and M. H. Hecht (2015). "Divergent evolution of a bifunctional de novo protein." Protein Sci **24**(2): 246-252.

Sonnenborn, U. and J. Schulze (2009). "The non-pathogenic Escherichia coli strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic." Microbial Ecology in Health and Disease **21**(3-4): 122-158.

Tan, G., J. Lu, J. P. Bitoun, H. Huang and H. Ding (2009). "IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in Escherichia coli under aerobic growth conditions." Biochem J **420**(3): 463-472.

Tenaillon, O., D. Skurnik, B. Picard and E. Denamur (2010). "The population genetics of commensal Escherichia coli." Nat Rev Microbiol **8**(3): 207-217.

Toh, H., K. Oshima, A. Toyoda, Y. Ogura, T. Ooka, H. Sasamoto, S. H. Park, S. Iyoda, K. Kurokawa, H. Morita, K. Itoh, T. D. Taylor, T. Hayashi and M. Hattori (2010). "Complete genome sequence of the wild-type commensal Escherichia coli strain SE15, belonging to phylogenetic group B2." J Bacteriol **192**(4): 1165-1166.

Tronnet, S., C. Garcie, N. Rehm, U. Dobrindt, E. Oswald and P. Martin (2016). "Iron Homeostasis Regulates the Genotoxicity of Escherichia coli That Produces Colibactin." Infect Immun **84**(12): 3358-3368.

Valdebenito, M., A. L. Crumbliss, G. Winkelmann and K. Hantke (2006). "Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in Escherichia coli strain Nissle 1917." Int J Med Microbiol **296**(8): 513-520.

Van Dyk, T. K. and R. A. LaRossa (1986). "Sensitivity of a Salmonella typhimurium aspC mutant to sulfometuron methyl, a potent inhibitor of acetolactate synthase II." J Bacteriol **165**(2): 386-392.

Vinella, D., C. Albrecht, M. Cashel and R. D'Ari (2005). "Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in Escherichia coli." Mol Microbiol **56**(4): 958-970.

Watts, R. E., M. Totsika, V. L. Challinor, A. N. Mabbett, G. C. Ulett, J. J. De Voss and M. A. Schembri (2012). "Contribution of siderophore systems to growth and urinary tract colonization of asymptomatic bacteriuria Escherichia coli." Infect Immun **80**(1): 333-344.