

Etude de la variabilité intra-espèce chez *Escherichia coli*

Jeremy Glodt

► **To cite this version:**

Jeremy Glodt. Etude de la variabilité intra-espèce chez *Escherichia coli*. Biologie cellulaire. 2012.
<hal-01468743>

HAL Id: hal-01468743

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01468743>

Submitted on 15 Feb 2017

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

Jérémy GLODT

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Etude de la variabilité intra-espèce chez
Escherichia coli

soutenu le 19 décembre 2012

devant le jury suivant :

Sylvie DEMIGNOT – Président
Odile BOUVET – Tuteur scientifique
Bernard MIGNOTTE – Tuteur pédagogique
Stephane BONACORSI – Rapporteur
Isabelle MARTIN-VERSTRAETE – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Odile BOUVET
U722 Ecologie et évolution des micro-organismes
16 rue Henri Huchard 75018 PARIS
odile.bouvet@inserm.fr
Directeur : Erick DENAMUR

et de

Bernard MIGNOTTE
Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines
Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire
45 avenue des Etats-Unis 78035 Versailles
bernard.mignotte@uvsq.fr
Directeur : Bernard MIGNOTTE. EPHE Sciences de la Vie et de la Terre

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

**Etude de la variabilité intra-espèce chez
*Escherichia coli***

Jérémy GLODT

Le

L'espèce *E.coli* se caractérise par une grande versatilité et une flexibilité métabolique qui lui permettent de coloniser de nombreuses niches. Pour étudier cette diversité, nous avons reconstruit et comparé les réseaux métaboliques de 14 souches à partir de leur génome. Nous montrons que leur métabolisme diffère principalement par les voies de dégradation des nutriments. L'étude des capacités nutritionnelles réalisée chez 153 souches a montré une forte disparité et une absence de spécialisation dans l'utilisation des sources de carbone. Les différences observées entre les données expérimentales et les prédictions traduisent des effets de régulation et/ou d'épistasie. Ces études ont permis d'identifier les voies de dégradation impliquées pour chaque substrat et d'utiliser la reconstruction des réseaux métaboliques des souches pour prédire la croissance. Pour étudier les stratégies adaptatives des *E.coli* commensaux et pathogènes, 5 souches ont été cultivées dans 4 milieux différents (LB, urine, glucose et gluconate) et leur contenu en protéines a été analysé. Même si les ressources disponibles dans le milieu conditionnent l'orientation générale du métabolisme, nous montrons la présence de réponses métaboliques particulières qui pourraient être importantes pour la survie et la colonisation. Le milieu glucose se caractérise par une forte demande en fer et l'urine par une réponse oxydante. Dans une autre étude, nous avons étudié ce déséquilibre entre la réponse oxydante et antioxydante durant la croissance dans urine chez 21 *E.coli* en mesurant les dommages oxydatifs au niveau des lipides membranaires. Nous montrons que certaines souches pourtant bien adaptées à ce milieu perçoivent l'urine comme un environnement stressant. Le niveau accru de ROS peut être responsable de mutations adaptatives. Un système de défense antioxydant plus actif pourrait accroître la capacité de coloniser la vessie. La diversité des réponses observées traduit l'importance des mécanismes de régulation dans l'adaptation des bactéries à leurs biotopes. Nos travaux futurs viseront à étudier ces mécanismes.

MOTS-CLÉS : *Escherichia coli*, adaptation, flux métabolique, stress oxydant, régulation.

Analyse bibliographique

I. Diversité dans l'espèce <i>Escherichia coli</i>	14
A- Diversité écologique de l'espèce <i>E. coli</i>	15
1. <i>E. coli</i> : commensal du tube digestif	15
2. <i>E. coli</i> : présence dans l'environnement	16
3. <i>E. coli</i> : espèce de laboratoire	16
4. <i>E. coli</i> : espèce pathogène	17
B- Diversité génomique de l'espèce <i>E. coli</i>	18

1. La collection ECOR : collection représentative de l'espèce	18
2. La notion de « core » génome et de « pan » génome	18
3. La structure phylogénétique de l'espèce <i>E. coli</i>	20
II. La voie métabolique	22
A- La réaction enzymatique	22
B- La cinétique enzymatique	23
III. Métabolisme central de <i>E. coli</i>	25
A- Rôle du métabolisme central	26
B- Les principales voies métaboliques du métabolisme central	28
1. La glycolyse	28
2. Le métabolisme du pyruvate	29
3. Réaction de liaison entre la glycolyse et le cycle de Krebs	30
4. Le cycle de Krebs	30
5. Le shunt glyoxylique	31
6. La néoglucogénèse	32
7. La voie des pentoses phosphates	32
8. La voie d'Entner Doudoroff	33
IV- Les bactéries et le fer	34
A- Le fer, une denrée rare mais indispensable à la croissance bactérienne	34
B- L'acquisition du fer par les bactéries	35
1. Acquisition directe	35
2. Production de sidérophores	35

Liste des abbreviations

% : Pour cent
[E] : concentration enzymatique
[Prot] : concentration protéique
[S] : concentration en Substrat
°C : degrés Celcius
µg : microgramme
µL : microlitre
µm : micromètre
µM : micromolaire
‰ : Pour mille
1/100 : un centième
1/10000 : un dix millième
2-KDPG : 2-keto-3-désoxyphosphogluconate
2-KG: 2-ketoglutarate
3PG : 3-phosphoglycérate
6PG : 6-phosphogluconate
6PGDH : 6-phospho-gluconate deshydrogénase
A : milieu minimum gluconate
ABC : adénosine triphosphate binding cassette
ABU : bactérie urinaire asymptomatique
Ac : anticorps
AcCoA : acétyl coenzyme A
acetyl-P : acetyl phosphate
Ack : acétate kinase
ACP : analyse en composante principale
Acs : Acétyl-Coenzyme A synthétase
ADN : acide désoxyribonucléique
AES : activité enzymatique spécifique
AhpC : alkyl hydroperoxidase C
al : *alii*
AMP : adenosine monophosphate
ANOVA : analyse de variance
AOA : acide oxaloacétique
AS : activité spécifique
ATP : adénosine triphosphate
BHT : hydroxytoluène butylé
CAS : chrome azurol S
CIT : citrate
cm : centimètre
CO₂ : dioxyde de carbone
CoA : coenzyme A
DAEC : *E. coli* à adhérence diffuse
d_G : distance génétique
DHAP : dihydroxyacétone phosphate
DHB : 2,3-dihydroxybenzoate

DNTB : acide 5,5'dithiobis 2-nitrobenzoate
DO : densité optique
 d_p : distance phénotypique
E : enzyme
E. coli : *Escherichia coli*
E. fergusonii : *Escherichia fergusonii*
EAEC : *E. coli* entéro-aggrégatifs
EC : Enzyme Commission
ECOR : *E. coli* reference collection
ED : voie d'Étner Doudoroff
EHEC : *E. coli* entéro-hémorragique
EIEC : *E. coli* entéro-invasive
EPEC : *E. coli* entéro-pathogènes
ETEC : *E. coli* entéro-toxinogènes
ExPEC : *E. coli* pathogène extraintestinale
F-1,6-BP : fructose-1,6-biphosphate
F1,6P : fructose 1,6-biphosphate
F6P : D-fructose-6-phosphate
FAD : flavine adénine dinucléotide
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide oxydé
FBA : fructose-biphosphate aldolase
FBP : fructose-1-6-biphosphatase
FUM : fumarate
G : milieu minimum glucose
G3P : glycéraldéhyde 3-phosphate
G6P : D-glucose-6-phosphate
G6PDH : glucose-6-phosphate deshydrogénase
GA : gluconate
Glc : glucose
Glc : glucokinase
GltA : citrate synthase
Gor : glutathion oxydoréductase
GSH : glutathion réduit
GshA : -glutamylcystéine synthase
GshB : glutathion synthase
GSSH : glutathion oxydé
h : heure
HPI : hydroxypéroxydase I
HPII : hydroxypéroxydase II
ICL : isocitrate lyase
ICT : isocitrate
IDH : isocitrate déshydrogénase
InPEC : *E. coli* pathogène intra intestinal
IS : séquence d'insertion
K_{cat} : constante de catalyse
K_M : constante de Michaelis-Menten
L : litre

lag : temps de latence
LB : Luria Bertani
LDA : analyse discriminante linéaire
LDH : lactate déshydrogénase
M : molaire
MAL : malate
MDA : malondialdehyde
MDH : malate déshydrogénase
MEZ : enzyme malique
mg : milligramme
min : minute
mL : millilitre
MLEE : multilocus enzyme electrophoresis
MLST : multilocus sequence typing
mM : millimolaire
Mol : mole
NaCl : chlorure de sodium
NADH₂ : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH₂ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
nm : nanomètre
nmole : nanomole
PBS : tampon phosphate salin
Pck : phosphoenolpyruvate carboxykinase
PEP : phosphoenolpyruvate
PFK : 6-phosphofructokinase
PGI : glucose-6-phosphate isomérase
PGP : 1,3 biphosphoglycérate
pH : potentiel hydrogène
POX : pyruvate oxydase
PPC : phosphoenolpyruvate carboxylase
Pta : phosphotransacétylase
PTS : phosphoenolpyruvate-glucose transférase système
Pyk : pyruvates kinase
PYR : pyruvate
R : milieu urine
R5P : ribose 5-phosphate
rmax : taux de croissance maximal
ROS : espèce réactive avec l'oxygène
rpm : rotation par minute
Ru5P : ribulose 5-phosphate
s : seconde
S : substrat
SOD : superoxyde dismutase
SUC : succinate
TBARS : thiobarbituric acid reactive substances
TBS : tampon tris salin

TCA : cycle de Krebs
TPI : triose phosphate isomérase
UPEC : *E. coli* uropathogène
USA : United State of America
UTI : urinary tract strains
v : vitesse
Vmax : vitesse maximale
X5P : xylulose 5-phosphate

I. Diversité dans l'espèce *Escherichia coli*

L'espèce bactérienne *E. coli* a été décrite par le médecin allemand Théodor Escherich (1857-1911) qui, en 1885, publia ses travaux sur un court bâtonnet à Gram négatif présent dans les matières fécales et l'intestin d'enfant. Cette espèce bactérienne fut baptisée *Bacillus coli commune*, puis renommée, en 1919 sur proposition et en 1958 officiellement, *Escherichia coli*, sur recommandation du Comité de Nomenclature de l' Association Internationale des Sociétés de Microbiologie.

A- Diversité écologique de l'espèce *E. coli*

1. *E. coli* : commensal du tube digestif

On retrouve principalement *E. coli* dans le tube digestif des vertébrés à sang chaud et des reptiles. D'un point de vue quantitatif il s'agit de l'espèce la plus importante parmi les bactéries aérobies du tube digestif. Chez l'Homme, la concentration de *E. coli* est comprise entre 10^7 et 10^9 par gramme de fèces ce qui représente 1/100 ou 1/10000 des bactéries totales par gramme de fèces (Berg et al., 1996). *E. coli* est l'une des premières bactéries à coloniser le tube digestif des nouveaux nés quelques heures après la naissance au niveau du mucus qui recouvre l'épithélium intestinale (Alteri et al., 2009). Pour cela, elle est qualifiée de commensale.

Néanmoins l'espèce dans l'intestin peut également être qualifiée de mutualisme, celle-ci trouvant les nutriments nécessaires à sa croissance mais jouant également un rôle important pour l'hôte comme la synthèse de vitamine K, la lutte contre des agents pathogènes et la stimulation du système immunitaire.

E. coli utilise préférentiellement les sucres et notamment le gluconate dans le tube digestif (Chang et al., 2004). La consommation de cette source de carbone est maximale dans des conditions d'anaérobiose ou de microaérobiose, qui sont les conditions habituelles de vie des bactéries dans l'intestin (Jones et al., 2007, Peekhaus et al., 1998). Cette capacité à utiliser certaines sources de carbones lui permettrait une implantation et une colonisation de cette niche de façon hautement spécifique (Kaper et al., 2004). Néanmoins *E. coli* est susceptible d'utiliser d'autres sources de carbone pour sa croissance dans le tube digestif comme le mannose, le galactose et le fucose. Des travaux sur les sources de carbone dans le tube digestif ont montré un lien entre la virulence ou le commensalisme de la souche et ses capacités à utiliser certaines sources de carbone.

2. *E. coli* : présence dans l'environnement

E. coli est retrouvé dans l'environnement où sa présence est associée à un facteur de contamination fécale. Des travaux récents montrent que cette présence peut mettre en évidence un mode de vie différent et des capacités d'adaptation importante (Power et al., 2005). Parmi les 10^{20} souches de *E. coli* estimées, 10^{10} proviendraient d'organismes vivants et 10^{10} seraient des souches de l'environnement (Savageau et al., 1983). Les conditions climatiques et nutritionnelles de l'environnement permettraient à certaines de ces souches de survivre et de se multiplier. Récemment, des souches de *E. coli* qui d'un point de vue génétique sont très éloignés des souches commensales du tube digestif ont été isolées dans l'eau de lacs australiens renforçant l'idée que *E. coli* est aussi un saprophyte de l'environnement (Power et al., 2005).

3. *E. coli* : espèce de laboratoire

E. coli est le procaryote le mieux étudié en recherche. La souche de référence est *E. coli* K-12 qui a servi de modèle pour l'accumulation des connaissances en génétique, physiologie, biologie moléculaire et biochimie. Il s'agit également du premier *E. coli* à avoir son génome complètement séquencé en 1997 (Blattner et al., 1997). Historiquement, *E. coli* K-12 a été isolé de fèces d'un patient atteint d'une diphtérie en 1922 à Palo Alto (USA) (Hobman et al., 2007). Cette souche a été conservée plusieurs années à l'université de Stanford avant d'être utilisée comme souche de référence par Charles Clifton puis Edward Tatum dans les années 1940. Elle a évolué sous l'effet des ultraviolets et d'une croissance dans différents milieux (gélose au sang ou en présence d'acridine orange). Plusieurs souches dérivent de cette souche de référence dont *E. coli* K-12 MG 1655 qui est étudiée dans notre laboratoire. Depuis, de nouveaux génomes de *E. coli* ont été séquencés et ont mis en évidence une grande diversité au sein de l'espèce. *E. coli* est habituellement étudié en milieu riche, milieu LB (Luria Bertani) ou en milieu minimum glucose. Ces conditions expérimentales sont très éloignées des habitats naturels de *E. coli* qui sont le tube digestif, l'urine ou l'eau. Le milieu de vie étant susceptible d'influencer l'expression des gènes de virulence, il est nécessaire que les souches soient étudiées dans des conditions mimant au mieux leur « style de vie » (Dougan et al., 2009).

4. *E. coli* : espèce pathogène

Il ne serait pas rigoureux de séparer les souches pathogènes des souches commensales car elles partagent toutes, même pour une courte durée, le même habitat qui est l'intestin de l'Homme et des animaux à sang chaud. Néanmoins d'un point de vue médical, il est nécessaire de les distinguer. Tout en étant moins nombreuses que les souches commensales et saprophytes, les souches pathogènes posent des problèmes de santé publique dans les pays en développement comme dans les pays riches (Kosek et al., 2003). La majorité des souches sont des pathogènes facultatifs de l'Homme et des animaux domestiques, à l'exception des souches de *E. coli* entéro-invasives (EIEC) et *Shigella* qui sont des pathogènes obligatoires (Nataro et al., 1998).

E. coli intervient dans le décès de deux millions de personnes par an dans le monde (Russo et al., 2003). Il provoque aussi bien des infections intestinales comme les diarrhées infantiles que des infections extra-intestinales comme les infections urinaires (cystites et pyélonéphrites) (Kosek et al., 2003, Russo et al., 2003). Les *E. coli* pathogènes intestinales sont appelés InPEC (*intestinal pathogenic E. coli*) et les *E. coli* pathogènes extra-intestinales sont appelés ExPEC (*extraintestinal pathogenic E. coli*). On distingue six pathovars au sein des InPEC :

- les *E. coli* entéro-toxinogènes (ETEC),
- les *E. coli* entéro-hémorragique (EHEC),
- les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) et les *Shigella*,
- les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC),
- les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC)
- et les *E. coli* entéro-aggrégatifs (EAEC) (Nataro et Kaper, 1998)

On distingue deux pathovars au sein des ExPEC

- les *E. coli* uropathogènes (UPEC)
- les *E. coli* responsables de méningite (meningitidis associated *E. coli* : MAEC)

L'infection par des *E. coli* pathogènes se déroule en plusieurs étapes qui sont la colonisation d'une muqueuse, l'échappement aux systèmes de défense de l'hôte puis la

multiplication dans ce site, voire la dissémination vers d'autres sites, ce qui entraîne différents dommages à l'hôte (Kaper et *al.*, 2004).

B- Diversité génomique de l'espèce *E. coli*

Dans le but d'étudier les raisons de ce polymorphisme écologique et afin de tenter de différencier les souches pathogènes des souches commensales, plusieurs travaux ont été réalisés sur le génome de l'espèce *E. coli*, permettant de mieux comprendre les déterminants de l'expression de la virulence.

1. La collection ECOR : collection représentative de l'espèce

Afin de représenter la diversité de l'espèce *E. coli*, plusieurs collections ont été rassemblées. La collection ECOR (« *E. coli* reference collection ») est la plus étudiée. Elle a été établie à partir de 2600 isolats naturels par Ochman et Selander en 1984 et est composée de 72 souches provenant de zones géographiques différentes (USA, Suède, Bali, Indonésie, Nouvelle-Guinée, Iles Tonga). Parmi ces souches, 61 proviennent de la flore fécale de sujets sains (humains ou espèces animales) et 11 souches isolées au cours de cystites ou de pyélonéphrites aiguës chez l'humain (Ochman et *al.*, 1984). Les souches ont été sélectionnées d'après leur variabilité électrophorétique pour 11 enzymes métaboliques, déterminées par électrophorèse en gel d'amidon lors d'étude de *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), et pour leur diversité d'hôtes (diversité d'espèce et diversité d'origine géographique). Des travaux antérieurs ont permis de générer d'importantes données génétiques et phénotypiques et conforter l'idée que cette collection est représentative de la diversité génétique et phénotypique de l'espèce.

2. La notion de « core » génome et de « pan » génome

Au sein de l'espèce *E. coli*, la taille du génome varie entre 4068 gènes et 5379 gènes ce qui représente une variation de plus de 1000 gènes entre 2 souches. Cette différence correspond à environ 500 protéines (Touchon et *al.*, 2009). Lors de la comparaison des 2 premiers génomes séquencés de *E. coli* (*E. coli* K-12 et *E. coli* O157:H7), il a été montré que seulement 30% des gènes sont communs aux deux souches (Perna et *al.*, 2001). Dix neuf autres génomes ont été séquencés plus récemment et ceci a permis de confirmer et de préciser ces données : une souche de *E. coli* possédant 4721 gènes dans son génome possède 1976 gènes en commun avec toutes les souches dont le génome a été séquencé (Hendrickson et *al.*, 2009). Ces gènes communs composent le « core » génome. Les autres gènes sont variables d'une souche à l'autre. L'ensemble des gènes communs et des gènes variables est appelé « pan » génome. Actuellement 21 génomes de *E. coli* sont séquencés et le « pan » génome correspondant à ces génomes contient 17838 gènes.

Les gènes du « pan » génome variables d'une souche à l'autre sont des éléments mobiles comme des séquences d'insertion (IS) ou des prophages mais peuvent également être des facteurs de virulence (Touchon et *al.*, 2009). Cette notion de « core » et de « pan » génome est extrêmement importante et renforce l'idée qu'une seule souche ne peut pas être représentative d'une espèce (Hobman et *al.*, 2007). Cette variabilité génétique contribue à la diversité phénotypique observée au sein de l'espèce et également une variabilité allélique toujours possible au sein du « core » génome.

3. La structure phylogénétique de l'espèce *E. coli*

Les premières données d'analyse de la phylogénie de l'espèce *E. coli* ont été effectuées par MLEE faisant intervenir 38 enzymes. Dans un second temps les analyses ont été réalisées sur

des données de MLST (Multi Locus Sequence Typing) de 72 souches de la collection ECOR. Ainsi quatre groupes phylogénétiques principaux ont été déterminés (A, B1, B2 et D) et deux groupes accessoires (C et E) (Herzer et *al.*, 1990, Selander et *al.*, 1987). Le groupe D peut être séparé en deux groupes, un groupe D et un groupe F, phylogénétiquement proche des B2 (Jaureguy et *al.*, 2008). Depuis peu, un arbre phylogénétique robuste réalisé sur les données les plus complètes disponibles a été obtenu à partir de 1878 gènes du « core » génome (Touchon et *al.*, 2009)

Les résultats des analyses phylogénétiques de l'espèce *E. coli* laissent supposer que le groupe le plus ancien, apparu il y a 40 millions d'années serait le groupe B2. Le groupe D se serait ensuite distingué puis seraient apparus les groupes A et B1 (Lecointre et *al.*, 1998). Les souches de Shigella et entéro-hémorragiques O157:H7 sont regroupés coupant l'arbre en deux avec d'une part les groupes B2 et D et d'autre part les groupes A et B1 (Escobar-Paramo et *al.*, 2003, Pupo et *al.*, 2000).

Une étude plus approfondie de la diversité génétique a pu mettre en évidence une grande diversité au sein du groupe B2 que l'on peut diviser en 9 sous-groupes (Touchon et *al.*, 2009). Parmi les 9 sous-groupes définis au sein du groupe B2 par Le Gall et *al.* en 2007, les souches des sous groupes II et IX seraient le plus souvent associées aux urosepsis (Jaureguy et *al.*, 2008).

II. La voie métabolique

A- La réaction enzymatique

Une enzyme est un catalyseur biologique qui accélère la transformation d'un métabolite en un autre par diminution de l'énergie d'activation nécessaire à cette réaction. Les enzymes augmentent la vitesse des réactions mais n'affectent en aucun cas leur constante d'équilibre : elles interviennent dans le mécanisme réactionnel mais pas dans l'équation bilan. Il existe un grand nombre de réactions chimiques spontanées entre métabolites permettant la production de composés variés. A l'inverse, une réaction enzymatique est en général spécifique et permet la production d'un produit en particulier à partir d'un ou plusieurs métabolites. Néanmoins plusieurs enzymes, sont capable de catalyser la même réaction : on parle dans ce cas d'isoenzymes. Les enzymes sont classées en catégories en fonction du type de réaction qu'elles catalysent.

B- La cinétique enzymatique

Une réaction enzymatique est souvent caractérisée par sa vitesse de formation des produits ou de consommation des substrats, appelée également flux lorsqu'il y a succession de réactions enzymatiques au sein d'un métabolisme. La vitesse d'une réaction est déterminée par la quantité de substrat consommé en fonction du temps dans un volume donné et s'exprime en mole par litre et par seconde ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$). La vitesse d'une réaction dépend de plusieurs facteurs. En 1913, Léonor Michaelis, biochimiste allemand, et Maud Menten, médecin canadienne, ont proposé un modèle simple exprimant la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la

concentration enzymatique [E], de la concentration de substrat [S] et de deux paramètres enzymatiques. Ce modèle repose sur un schéma réactionnel simple dans lequel le substrat S se lie de manière réversible à l'enzyme E avant d'être transformé irréversiblement en produit P :



où K_1 , K_{-1} et K_{cat} sont des constantes de vitesse des réactions élémentaire. Il y a une relation entre la vitesse de réaction v et la concentration de substrat [S] qui est hyperbolique et exprimée par l'équation de Michaelis-Menten :

où K_M est la constante de Michaelis-Menten et V_{max} la vitesse maximale. La vitesse maximale correspond à la vitesse de transformation la plus rapide d'un substrat présent en quantité saturante en produit au cours du temps pour une enzyme donnée et dans les conditions de l'expérimentation.

Elle est proportionnelle à la concentration enzymatique et traduit l'efficacité de la catalyse :

$$V_{max} = K_{cat}[E]$$

où [E] est la concentration enzymatique et K_{cat} la constante de catalyse. La vitesse maximale est exprimée en nombre de moles de substrat converties par unité de temps et de volume ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$). La constante de Michaelis-Menten K_M correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction vaut la moitié de la vitesse maximale. La K_M reflète l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus la K_M est faible et plus l'enzyme a une sensibilité élevée et réagit à de faibles concentrations de substrats.

Toutes les enzymes n'ont pas une cinétique Michaelienne et beaucoup suivent des schémas réactionnels plus complexes. C'est le cas des enzymes allostériques qui ont des paramètres cinétiques tels que la relation entre la vitesse de réaction et la quantité de substrat est une sigmoïde et non une hyperbole.

C- La régulation métabolique

Pour croître de la meilleure façon possible, un organisme doit s'adapter aux conditions du milieu extérieur et doit ainsi réguler les flux de ses différentes réactions métaboliques en fonction des capacités et des besoins de la cellule. Il existe trois principaux mécanismes de régulation (Neidhardt et *al.*, 1990). Le premier consiste à jouer sur la concentration enzymatique. La V_{max} étant dépendante de cette concentration est alors modifiée ce qui modifie également la vitesse de réaction. Un organisme est capable de faire varier la vitesse de production de certaines de ses enzymes par activation ou inhibition de la transcription en réponse à des régulateurs globaux ou spécifiques. Il existe également des mécanismes de régulation de la dégradation des enzymes. Ainsi, en fonction des nutriments présents dans leur environnement, les bactéries ne vont pas utiliser les mêmes voies métaboliques. Cette régulation peut alors donner un avantage adaptatif ce qui a été montré sur des souches de

E. coli évoluant dans des milieux contenant des concentrations de substrat variables (Deket et *al.*,

2005). Le deuxième mécanisme de régulation est la liaison réversible d'un effecteur. Dans cette situation, il y a liaison entre l'enzyme et une molécule, ce qui modifie la conformation de l'enzyme et modifie alors les paramètres enzymatiques tel que la K_M ou la K_{cat} . Le dernier mécanisme de régulation est l'activation ou l'inactivation de l'enzyme par liaison covalente. Ceci est effectué par une enzyme extérieure qui va par exemple phosphoryler, déphosphoryler ou acétyler les enzymes à réguler (Wang et *al.*, 2010). Ces différents mécanismes de régulation ont non seulement un rôle de contrôle des flux métaboliques mais également un rôle d'économie des ressources en ne synthétisant les enzymes qu'aux moments adéquats par exemple (Zaslaver et *al.*, 2004).

III. Métabolisme central de *E. coli*

Au sein du métabolisme central on peut distinguer deux type de voies : les voies anaboliques qui sont les voies de biosynthèse et les voies cataboliques qui sont les voies d'approvisionnement en précurseurs métaboliques. Le caractère anabolique ou catabolique d'une voie métabolique dépend du substrat majoritaire du milieu de croissance. Une même enzyme peut à la fois participer soit à des réactions anaboliques ou des réactions cataboliques en fonction des conditions de croissance. L'ensemble de ces deux voies est appelé métabolisme amphibolique (Sanwal, 1970) mais le terme métabolisme central est le plus souvent utilisé. Comme nous allons le voir, le classement des enzymes est schématique. C'est pour cette raison que tout au long de notre travail, au profit de la clarté, nous parlerons uniquement de métabolisme central pour l'ensemble des voies métaboliques (anaboliques et cataboliques) étudiées.

A- Rôle du métabolisme central

Le métabolisme central a trois grands rôles dans la cellule : il génère du pouvoir réducteur sous forme de coenzymes réduits ($NADH_2$, $NADPH_2$, $FADH_2$), de l'énergie (ATP ou autres molécules riches en énergie comme le phosphoénolpyruvate (PEP) ou l'acétyl-phosphate), et des précurseurs pour les voies de biosynthèse. Le métabolisme central est composé en quatre grandes voies principales qui sont la glycolyse, la voie des pentoses phosphate, la voie d'Entner Doudoroff et le cycle de Krebs. Il existe des réactions enzymatiques qui font le lien entre les voies du métabolisme central et les précurseurs des voies de biosynthèse. Ces réactions sont qualifiées de réaction anaplérotiques

Il y a 13 métabolites précurseurs des voies de biosynthèse : le glucose-6-phosphate, le fructose-6-phosphate, le ribose-5-phosphate, l'érythrose-4-phosphate, le sédoheptulose-7-phosphate, le triose phosphate, le 3-phosphoglycérate, le phosphoenolpyruvate, le pyruvate, l'acétyl-CoA, le 2-oxoglutarate, le succinyl-CoA et l'oxaloacétate. Le tableau 2 résume les précurseurs utilisés pour la synthèse des acides aminés (Gottschalk, 1988).

La néoglucogénèse, parfois qualifiée de voie du métabolisme intermédiaire, est une des voies de biosynthèse qui émerge du métabolisme central (El-Mansi et *al.*, 2006, Sabnis et *al.*, 1995). Beaucoup d'enzymes de la néoglucogénèse et de la glycolyse sont communes (Gottschalk, 1988).

B- Les principales voies métaboliques du métabolisme central

1. La glycolyse

La glycolyse est l'ensemble des réactions qui permettent l'oxydation du glucose-6-phosphate en pyruvate (Gottschalk, 1988).

Dans la cellule bactérienne le D-glucose est essentiellement sous la forme phosphorylée (D-glucose-6-phosphate). Le transport de cette molécule fait intervenir un transporteur dépendant du phosphoenolpyruvate (PEP), appelé encore PTS pour phosphoenolpyruvate-glucose transférase système.

Afin que les disaccharides comme le lactose ou le maltose soit pris en charge dans la cellule par cette voie de la glycolyse, ces molécules sont phosphorylées par la glucokinase (Glk). L'expression du gène *glk* codant pour cette enzyme est réprimée en présence de glucose dans la cellule ainsi que par le régulateur transcriptionnel Cra (Meyer et al., 1997). La Glk est inhibée par le PEP (Ogawa et al., 2007).

La glycolyse fait appel à neuf enzymes et aboutit à la production de cinq précurseurs métaboliques qui sont le D-glucose-6-phosphate, le D-fructose-6-phosphate, le 3-phosphoglycérate, le PEP et pyruvate. Les activités des enzymes sont réversibles mises à part la 6-phosphofructokinase (PFK) et la pyruvate kinase (Sabnis et al., 1995).

Au sein de la glycolyse, certaines réactions sont plus importantes que les autres car elles génèrent des métabolites clés ou présentent des particularités. C'est le cas de la glucose-6-phosphate isomérase (PGI) qui transforme de façon réversible le D-glucose-6-phosphate (G6P) en D-fructose-6-phosphate (F6P). Des travaux récents ont mis en évidence que la transcription du gène *pgi* codant pour la PGI était sous la dépendance du régulateur transcriptionnel SoxRS. La protéine SoxR possède un centre fer-soufre, qui, lorsqu'elle est oxydée se fixe au régulateur transcriptionnel du gène *soxS*. Ceci aboutit à une production de protéines SoxS qui ont pour rôle d'activer la transcription de plusieurs gènes ayant un rôle direct dans les mécanismes de défenses antioxydante (Pomposiello et al., 2001, Rungrassamee et al., 2008). L'activité de la PGI est inhibée de façon allostérique par le 6-phosphogluconate (Schreyer et al., 1980, Chassagnole et al., 2002).

2. Le métabolisme du pyruvate

Au sein des voies métaboliques, on peut dire que le pyruvate se situe à un carrefour. En effet il se trouve à l'interconnection de la glycolyse, du cycle de Krebs, des voies de fermentation ainsi que du métabolisme de l'acétate (figure 5). La dégradation du pyruvate dépend des conditions d'aération du milieu de croissance. Dans des conditions d'aérobiose, celui-ci est décarboxylé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. En absence d'oxygène le pyruvate est transformé à la fois en acétyl-CoA et en formate par la pyruvate formate lyase ou en D-lactate par la D-lactate déshydrogénase. Il est possible que le pyruvate soit transformé en PEP. Pour cela il y a utilisation de la PEP synthétase. Cette enzyme réalise la réaction inverse permettant à partir du pyruvate de produire du PEP utilisé pour la néoglucogénèse. Pour se faire, cette réaction doit hydrolyser une molécule d'ATP.

Le pyruvate est décarboxylé en acétate par l'action de la pyruvate oxydase (POX). Cette enzyme est active lors de la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire et en

présence d'oxygène. Cette réaction nécessite l'oxydation d'une molécule de FAD en FADH₂ (Wolfe, 2005).

3. Réaction de liaison entre la glycolyse et le cycle de Krebs

L'enzyme qui assure le lien entre la glycolyse et le cycle de Krebs est la PEP carboxylase (PPC), qui oxyde le PEP en oxaloacétate. Pour se faire cette réaction nécessite une molécule d'ATP. La PPC est activée par le F-1,6-BP et son activité est inhibée par l'aspartate et le L-malate (Chassagnole et *al.*, 2002). En présence de trop forte concentration en F-1,6-BP (précurseur du PEP) et d'acétyl-CoA dans la cellule, l'activité de la PPC est augmentée afin d'éviter une surcharge de précurseurs du cycle de Krebs.

4. Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs a deux grands rôles dans la cellule : l'apport d'énergie sous forme d'ATP par l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO₂ et la réduction des coenzymes nécessaires au bon fonctionnement de la chaîne respiratoire. Le cycle de Krebs est très lié aux réactions anaplérotiques car il alimente les voies de biosynthèse en précurseurs métaboliques à 4 carbones (oxaloacétate, L-malate, succinyl-CoA, 2-oxoglutarate) (Neidhardt et *al.*, 1990).

L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs en se joignant à l'oxaloacétate produit par deux mécanismes : soit à partir du L-malate par la malate déshydrogénase, soit à partir du PEP par la PPC.

La citrate synthase est l'enzyme qui permet l'association de l'acétyl-CoA à l'oxaloacétate pour aboutir à la formation d'une molécule de citrate. Le 2-oxoglutarate qui est un intermédiaire métabolique du cycle de Krebs mais également un précurseur d'acides aminés tels que la glutamine, l'arginine et la proline inhibe de manière compétitrice l'activité de la citrate synthase. L'oxaloacétate est régénéré par une succession de réactions enzymatiques dont certaines nécessitent des régulations spécifiques. C'est le cas de l'isocitrate déshydrogénase (IDH). Cette enzyme catalyse la transformation de l'isocitrate en 2-oxoglutarate en libérant une molécule de CO₂ et en réduisant une molécule de NADP⁺ en NADPH+H⁺. Sa régulation s'effectue par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation d'une sérine au niveau de son site actif. Lorsqu'il y a cette phosphorylation l'isocitrate ne peut plus se fixer sur le site actif ce qui entraîne l'inhibition de l'IDH. Cette phosphorylation est effectuée par l'IDH kinase/phosphatase dont l'activité est dépendante de la transcription du gène *aceK* codant pour cette phosphatase (Stueland et *al.*, 1988). Le gène *aceK* est situé sur l'opéron *aceBAK* à côté des gènes *icl* et *mas* codant respectivement pour l'isocitrate lyase (ICL) et la malate synthétase qui sont les 2 enzymes du shunt glyoxylique. L'activation de l'IDH kinase et de l'ICL ainsi que l'inhibition de l'IDH sont donc associées. La transcription de l'opéron *aceBAK* est activée par Cra et IHF et réprimée par IclR qui sont des régulateurs globaux (Prost et *al.*, 1999, Cozzone et *al.*, 2005).

Il y a trois autres réactions dans le cycle de Krebs qui permettent la réduction de coenzymes. Ces réactions sont catalysées par la 2-oxoglutarate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase et la malate déshydrogénase.

5. Le shunt glyoxylique

Il s'agit d'une voie anabolique ne créant pas d'énergie. Son but est d'éviter l'oxydation complète des composés à 4 carbones en CO₂, afin de produire du PEP ou de l'oxaloacétate nécessaire aux réactions de biosynthèse. Pour se faire il y a deux réactions enzymatiques qui sont les suivantes : la transformation de l'isocitrate en glyoxylate et succinate catalysée par l'isocitrate

lyase (ICL) et la synthèse du L-malate à partir du glyoxylate par la malate synthétase. Le shunt glyoxylique est activée par tout substrat générant de l'acétyl-CoA. L'isocitrate étant le substrat en commun entre le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique, ceux-ci sont en compétition. Comme cela a été expliqué dans le paragraphe précédent, les systèmes de régulation de l'ICL et de l'IDH sont étroitement liés et dépendent du substrat préférentiel et de régulateurs transcriptionnels (Kornberg, 1966, Saier *et al.*, 1996).

6. La néoglucogénèse

Il s'agit d'une voie de biosynthèse dans laquelle la molécule de départ est l'acétyl-CoA produit suite à différents précurseurs (glucidique, peptidiques et lipidiques) ou au niveau du cycle de Krebs. Lorsque la cellule se trouve avec des besoins importants de biosynthèse, l'acétyl-CoA peut rapidement former du malate grâce à la malate synthétase du shunt glyoxylique. Le malate va ensuite être transformé en pyruvate par des réactions anaplerotiques. Du PEP peut ensuite être formé à partir du pyruvate par la PEP synthétase. Le PEP peut également être formé via l'oxaloacétate par la PEP carboxykinase, ceci coûtant une liaison riche en énergie. Le PEP subit les réactions inverses de la glycolyse ayant permis d'oxyder le F-1-6-BP en PEP qui sont réversibles à l'exception de 2 réactions. La PEP synthétase permet la réaction inverse de la pyruvate kinase et la fructose-1-6-biphosphatase permet la déphosphorylation du F-1-6-BP en fructose 6-phosphate. Il a été montré que l'activité de la FBP était augmentée en présence de gluconate (Peng *et al.*, 2003).

A l'inverse de la glycolyse, certaines enzymes de la néoglucogénèse, la Pck et la FBP sont activées par le régulateur transcriptionnel Cra en présence de substrat de la néoglucogénèse (Saier *et al.*, 1996).

7. La voie des pentoses phosphates

Cette voie permet la production d'intermédiaires métaboliques tels que le ribose-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate, l'érythrose-4-phosphate et le sedoheptulose-7-phosphate nécessaires à la biosynthèse des nucléotides et d'acide aminés aromatiques. Elle permet également de générer du NADPH nécessaire aux réactions de biosynthèse ainsi que la réduction du glutathion oxydé. Le NADPH est nécessaire à l'hydrogénation dans les réactions de biosynthèse comme agent réducteur.

Ce cycle est composé de deux parties. La première est dite oxydative : le glucose-6-phosphate est oxydé en ribulose-5-phosphate. Dans la deuxième, le ribulose-5-phosphate est réduit en fructose-6-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate par l'intermédiaire de transaldolases et transcétolases. Le cycle des pentoses phosphates réduit deux molécules de NADP^+ en $\text{NADPH} + \text{H}^+$ lors des réactions catalysées par la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) et la 6-phospho-gluconate deshydrogénase (6PGDH). Le NADPH inhibe de façon allostérique la G6PDH et la 6PGDH (Zaslaver *et al.*, 2004). La 6PGDH est également inhibée par l'ATP. La G6PDH participe à la restauration des réserves intracellulaires du NADPH (Pomposiello *et al.*, 2001).

8. La voie d'Entner Doudoroff

Il s'agit de la voie qui permet de dégrader les sucres acides. Par ordre d'importance c'est la seconde voie métabolique. L'utilisation de la voie d'Entner Doudoroff dépend de la source de carbone présente dans l'environnement. *E. coli* utilise cette voie notamment en présence de gluconate pour sa dégradation. Les deux enzymes clés de cette voie métabolique sont la 6-

phosphogluconate deshydratase qui transforme le 6-phosphogluconate en 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate, et le 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate aldolase qui transforme le 2-kéto-3-désoxy-6-phosphogluconate en 3-phosphoglycéraldéhyde. Le 6-phosphogluconate est issu de la phosphorylation du gluconate par l'intermédiaire de la gluconate kinase ou de l'oxydation du glucose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Gottschalk, 1988).

IV- Les bactéries et le fer

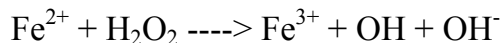
Pour la plupart des formes de vie, le fer est indispensable car il s'agit d'un cofacteur essentiel à de nombreuses réactions enzymatiques.

Le fer a un rôle dans de nombreuses réactions métaboliques et réactions biologiques via son incorporation dans des protéines : les hémoprotéines. Celles-ci sont impliquées dans des fonctions indispensables, comme par exemple : la photosynthèse, l'élimination des radicaux libres et des peroxydes (peroxydase, superoxyde dismutase), la respiration (cytochrome) ou bien la synthèse d'ADN (ribonucléotides réductase)...

A- Le fer, une denrée rare mais indispensable à la croissance bactérienne

Lors d'une infection bactérienne, la bactérie pathogène trouve tous les nutriments nécessaires à sa croissance sauf le fer. Il est capable d'exister dans deux états d'oxydoréduction en équilibre : sous forme réduite appelée fer ferreux (Fe^{2+}) soluble dans l'eau et sous forme oxydée appelé fer ferrique (Fe^{3+}) qui est insoluble et précipite à pH neutre dans l'eau.

En trop grande quantité intracellulaire, le fer ferreux est toxique pour *E. coli*. En effet, en entrant dans la bactérie, le Fe^{2+} est réduit en Fe^{3+} par des réductases. L'excès de Fe^{2+} réagit avec l' H_2O_2 produisant des radicaux libres toxiques selon la réaction de Fenton présente ci-après.



Cette réaction produit des composés hydroxyles OH^- qui sont des éléments toxiques pour la bactérie. Cette dernière possède donc des systèmes de défense antioxydant pour se protéger des radicaux libres : il s'agit des catalases, peroxydases et superoxydes dismutases.

Les bactéries et plus particulièrement les pathogènes ont du évoluer afin d'acquérir, de transporter et de stocker le fer. Le processus de privation de fer à une bactérie infectante a déjà été démontré comme étant un mécanisme de défense important de l'hôte.

B- L'acquisition du fer par les bactéries

1. Acquisition directe

Les bactéries arrivent toutefois à se procurer du fer afin de se multiplier. Chez les bactéries à Gram négatif, la source de fer doit traverser les deux membranes (externe et cytoplasmique) constituant la paroi cellulaire en passant par le périplasme, afin d'être utilisée par la bactérie. Dans le cas du fer ferreux, le passage à travers la membrane externe peut se faire par l'intermédiaire des porines jusqu'au périplasme. Ensuite, il est transporté dans le cytoplasme par un transporteur spécifique codé par le gène *efeO*.

Le fer ferrique peut également entrer dans la bactérie lorsqu'il est complexé à des protéines ou à des molécules chimiques. Dans ce dernier cas, il utilise des transporteurs

particuliers en fonction de l'élément qui le complexe : FecA, transporteur du citrate de fer et FhuA, transporteur de ferrichrome.

2. Production de sidérophores

Les bactéries sont également capables de synthétiser et de sécréter des molécules permettant de fixer et d'internaliser le fer ferrique. Ces molécules portent le nom de sidérophore. Ils sont produits lorsque le milieu de croissance est déficient en fer. Tous micro-organismes confondus produisent plus de 500 sidérophores différents. La production de sidérophores par les bactéries n'est pas systématiquement un critère de virulence et inversement leur absence de production ne signifie pas que la bactérie est non pathogène.

Deux grand types de sidérophores sont décrits chez *E. coli*. Ceux-ci sont classés au moyen de leur mode de fixation au fer et du groupe fonctionnel donneur d'oxygène impliqué (Miethke et al., 2007). Le premier groupe se compose des sidérophores de type phénolate-catécholate qui ont une structure primaire dérivée du 2,3-dihydroxybenzoate (DHB); et sont représentés par l'entérobactine. Les radicaux hydroxyles permettant la liaison avec le fer se trouvent sur des noyaux adjacents catéchol. Le deuxième groupe comprend les sidérophores de type hydroxamate comme la desferroxamine.

Depuis quelques années, il y a une accumulation de connaissances sur ces molécules et il a été mis en évidence que plusieurs sidérophores portaient les caractéristiques d'au moins deux groupes : on parlerait alors de type « mixte » (exemple : aérobactine).

Les sidérophores ont un pouvoir de liaison pour le fer assez fort au point de pouvoir le complexer même s'il est déjà lié fortement à des molécules. Ceci permet aux microorganismes synthétisant des sidérophores d'acquérir le fer à partir d'un milieu de culture.

Les complexes Fer-sidérophore franchissent la membrane externe par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques : exemples : IutA, récepteur du complexe aérobactine-Fe³⁺ ; fepA, récepteur du complexe entérobactine-Fe³⁺. Ces complexes sont reconnus et pris en charge par des systèmes de transport de type ABC (ATP binding cassette). Ils sont constitués d'une ou de plusieurs protéines périplasmiques de liaison au substrat, d'une ou deux perméases membranaires et d'une ou deux ATP hydrolases, associées à la membrane cytoplasmique qui fournissent de l'énergie au système (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003).

En cas d'infection, les bactéries peuvent récupérer du fer au niveau de l'hème de l'hôte. Certains *E. coli* possèdent un gène chromosomique *chuA* (pour coli-haem-utilisation A) qui code pour une protéine de membrane externe synthétisée lors d'une limitation en fer. Cette protéine permet la fixation de l'hème (Torres et al., 1997). Ce gène est présent chez tous les *E. coli* du groupe phylogénétique B2 et D, ce qui en fait un marqueur génotypique.

L'entrée du fer dans le cytoplasme se fait ensuite par un système de transport de type ABC. Ce système est TonB-dépendant. TonB a pour rôle d'apporter l'énergie nécessaire à l'internalisation de l'hème.

Une fois arrivé dans le cytoplasme, le Fe³⁺ est libéré de son complexe et est immédiatement pris en charge par une réductase qui le réduit en Fe²⁺.

Références bibliographiques

ALEXEEVA S, DE KORT B, SAWERS G, HELLINGWERF KJ, DE MATTOS MJ., (2000). Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 182, 4934-4940.

ALTERI C.J., SMITH S.N., MOBLEY H.L., (2009). Fitness of *Escherichia coli* during urinary infection requires gluconeogenesis and TCA cycle. *PLoS Pathogen*, 5, e1000448.

BAUMANN P., BAUMANN L., (1975). Catabolism of D-fructose and D-ribose by *Pseudomonas doadoroffii*. I. Physiological studies and mutant analysis. *Arch Microbiol*, 105, 241-248.

BERG R.D., (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-435.

BLATTNER F.R., PLUNKETT G., BLOCH C.A., PERNA N.T., BURLAND V., RILEY M., COLLADO-VIDES J., GLASNER J.D., RODE C.K., MAYHEW G.F., GREGOR J., DAVIS N.W., KIRKPATRICK H. A., GOEDEN M.A., ROSE D.J., MAU B., SHAO Y., (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277, 1453-1474.

BRADFORD M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.

CASPI R., ALTMAN T., DALE J.M., DREHER K., FULCHER C.A., GILHAM F., KAIPA P., KARTHIKEYAN A.S. ET AL., (2010). The metacyc database of metabolic pathways and enzymes and the biocyc collection of pathway / genome databases. *Nucleic Acids Res*, 38, D473-9.

CESCAU S., CWERMAN H., LETOFFE S., DELEPELAIRE P., WANDERSMAN C., BIVILLE F., (2007). Heme acquisition by hemophores. *Biometals*, 20, 603-613.

CHANG D.E., SMALLEY D.J., TUCKER D.L., LEATHAM M.P., NORRIS W.E., STEVENSON S.J., ANDERSON A.B., GRISSOM J.E., LAUX D.C., COHEN P.S., CONWAY T., (2004). Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7427-7432.

CHASSAGNOLE C., NOISOMMIT-RIZZI N., SCHMID J.W., MAUCH K., REUSS M., (2002). dynamic modeling of the central carbon metabolism of *escherichia coli*. *biotechnol bioeng*, 79, 53-73.

CLERMONT O., LESCAT M., O'BRIEN C.L., GORDON D.M., TENAILLON O., DENAMUR E., (2008). Evidence for a human-specific *Escherichia coli* clone. *Environ Microbiol*, 10, 1000-1006.

CONRAD R., SCHLEGEL H.G., (1977). Different degradation pathways for glucose and fructose in *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch Microbiol*, 112, 39-48.

COZZONE A.J., EL-MANSI M., (2005). Control of isocitrate dehydrogenase catalytic activity by protein phosphorylation in *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol, 9, 132-146.

DEKEL E., ALON U., (2005). Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. Nature, 436, 588-592.

DENAMUR E., LECOINTRE G., DARLU P., TENAILLON O., ACQUAVIVA C., SAYADA C., SUNJEVARIC I., ROTHSTEIN R., ELION J., TADDEI F., RADMAN M., MATIC I., (2000). Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. Cell. 103, 711-21.

DOUGAN G., (2009). Does the Trojan horse have an Achilles' heel? New England J Med, 360, 83-84.

EL-MANSI M., COZZONE A.J., SHILOACH J., EIKMANN B.J., (2006). Control of carbon flux through enzymes of central and intermediary metabolism during growth of *Escherichia coli* on acetate. Curr Opin Microbiol, 9, 173-179.

ESCOBAR-PARAMO P., CLERMONT O., BLANC-POTARD A.B., BUI H., LE BOUGUENEC C., DENAMUR E., (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Mol Biol Evol, 21, 1085-1094.

ESCOBAR-PARAMO P., GIUDICELLI C., PARSOT C., DENAMUR E., (2003). The evolutionary history of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. J. Mol Evol, 57, 140-148.

FARALDO-GOMEZ J.D., AND SANSOM M.S., (2003). Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 105-116.

GARCIA-OLALLA C., GARRIDO-PERTIERRA A., (1987). Purification and kinetic properties of pyruvate kinase isoenzymes of *Salmonella typhimurium*. Biochem J, 241, 573-581.

GORDON D.M., COWLING A., (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiol, 149, 3575-3586.

GOTTSCHALK G., (1988). Bacterial Metabolism, springer Verlag New-York Inc. P 357.

HENDRICKSON H., (2009). Order and disorder during *Escherichia coli* divergence. PloS Genet, 5, e1000335.

HERZER P.J., INOUE S., INOUE M., WHITTAM T.S., (1990). Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J. Bacteriol, 172, 6175-6181.

HOBMAN J.L., PENN W., PALLEN M.J., (2007). LABORATORY STRAINS OF

ESCHERICHIA COLI: MODEL CITIZENS OR DECEITFUL DELINQUENTS GROWING OLD DISGRACEFULLY? *MOL MICROBIOL*, 64, 881-885.

JAUREGUY F., LANDRAUD L., PASSET V., DIANCOURT L., FRAPY E., GUIGON G., CARBONELLE E., LORTHOLARY O., CLERMONT O., DENAMUR E., PICARD B., NASSIF X., BRISSE S., (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9, 560.

JONES S.A., CHOWDHURY F.Z., FABICH A.J., ANDERSON A., SCHREINER D.M., HOUSE A.L., AUTIERI S.M., LEATHAM M.P., LINS J.J., JORGENSEN M., COHEN P.S., CONWAY T., (2007). Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infect Immun*, 75, 4891-4899.

KAPER J.B., NATARO J.P., MOBLEY H.L., (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2, 123-140.

KORNBERG H.L., (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 99, 1-11.

KOSEK M., BERN C., GUERRANT R.L., (2003). The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ*, 81, 197-204.

LAMED R., ZEIKUS J.G., (1980). Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of and catabolic enzyme activities in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobium brockii*. *J Bacteriol*, 144, 569-578.

LE GALL T., CLERMONT O., GOURIOU S., PICARD B., NASSIF X., DENAMUR E., TENAILLON O., (2007). Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalisms in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol Biol Evol*, 24, 2373-2384.

LECOINTRE G., RACHDI L., DARLU P., DENAMUR E., (1998). *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Mol Biol Evol*, 15, 1685-1695.

MAEBA P., SANWAL B.D., (1969). Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Salmonella*. Some chemical and allosteric properties. *J Biol Chem*, 244, 2549-2557.

MEYER D., SCHNEIDER-FRESENIUS C., HORLACHER R., PEIST R., BOOS W., (1997). MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GLUCOKINASE FROM *ESCHERICHIA COLI* K-12. *J BACTERIOL*, 179, 1298-1306.

MIETHKE M., MARAHIEL M.A., (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 413-451.

MIETHKE M., AND MARAHIEL M.A., (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 413-451.

MOBLEY H.L., GREEN D.M., TRIFILLIS A.L., JOHNSON D.E., CHIPPENDALE G.R., LOCKATELL C.V., JONES B.D., WARREN J.W., (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*, 58, 1281-1289.

NATARO J.P., KAPER J. B., (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11, 142-201.

NEIDHARDT F., INGRAHAM J., SCHAECHTER M., (1990). Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sunderland, Massachusetts, U S A. p506.

OCHMAN H., SELANDER R.K., (1984). Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*, 157, 690-693.

OGAWA T., MORI H., TOMITA M., YOSHINO M., (2007). Inhibitory effect of phosphoenolpyruvate on glycolytic enzymes in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 158, 159-163.

PARVIN R., (1969). *Methods in enzymology*, vol13, 16-19.

PEEKHAUS N., CONWAY T., (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 180, 3495-3502.

PENG L., SHIMIZU K., (2003). Global metabolic regulation analysis for *Escherichia coli* K12 based on protein expression by 2-dimensional electrophoresis and enzyme activity measurement. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61, 163-178.

PERNA N.T., PLUNKETT G., BURLAND V., MAU B., GLASNER J.D., ROSE D.J., MAYHEW G.F., EVANS P.S., GREGOR J., KIRKPATRICK H.A., POSFAI G., HACKETT J., KLINK S, BOUTIN A., SHAO Y., MILLER L., GROTEBECK E.J., DAVIS N.W., LIM A., DIMALANTA E.T., POTAMOUSIS K.D., APODACA J., ANANTHARAMAN T.S., LIN J., YEN G., SCHWARTZ D.C., WELCH R.A., BLATTNER F.R., (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 409, 529-533

PICARD B., GARCIA J.S., GOURIOU S., DURIEZ P., BRAHIMI N., BINGEN E., ELION J., DENAMUR E., (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*, 67, 546-553.

POMPOSIELLO P.J., DEMPLE B., (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends Biotechnol*, 19, 109-114.

POWER M.L., LITTLEFIELD-WYER J., GORDON D.M., VEAL D.A., SLADE M.B., (2005). Phenotypic and genotypic characterization of encapsulated *Escherichia coli* isolated from blooms in two Australian lakes. *Environ Microbio*, 7, 631-640.

PROST J.F., NEGRE D., OUDOT C., MURAKAMI K., ISHIHAMA A., COZZONE A.J., CORTAY J.C., (1999). Cra-dependent transcriptional activation of the *icd* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181, 893-898.

PUPO G.M., LAN R., REEVES P.R., (2000). Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 105467-105472.

RASKO D.A., ROSOVITZ M.J., MYERS G.S., MONGODIN E.F., FRICKE W.F., GAJER P., CRABTREE J., SEBAIHIA M., THOMSON N.R., CHAUDHURI R., HENDERSON I.R., SPERANDIO V., RAVEL J., (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. J Bacteriol, 190, 6881-6893.

RAYMOND K.N., DERTZ E.A., KIM S.S., (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. Proc Natl Acad Sci U S A, 100, 3584-3588.

ROOS V., ULETT G.C., SCHEMBRI M.A., KLEMM P., (2006). The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. Infect Immun, 74, 615-624.

RUNGRASSAMEE W., LIU X., POMPOSIELLO P.J., (2008). Activation of glucose transport under oxidative stress in *Escherichia coli*. Arch Microbiol, 190, 41-49.

RUSSO T.A., JOHNSON J.R., (2003). Medical and economic impact of extraintestinal infection due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. Microbes Infect, 5, 449-456.

SABNIS N.A., YANG H., ROMEO T., (1995). Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in *Escherichia coli* via the gene *csrA*. J Biol Chem, 270, 29096-29104.
Saier M.H. Jr., Ramseier T.M., (1996). The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. J Bacteriol, 178, 3411-3417.

SAMUELOV N.S., LAMED R., LOWE S., ZEIKUS J.G., (1991). Influence of CO₂-HCO₃ Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Appl Environ Microbiol, 57, 3013-3019.

SANWAL B.D., (1970). Allosteric controls of amphibolic pathways in bacteria. Bacteriol Rev, 34, 20-39.

SAVAGEAU M.A., (1983). *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. Am Nat, 122, 732-744.

SCHREYER R., BÖCK A., (1980). Phosphoglucose isomerase from *Escherichia coli* K 10: purification, properties and formation under aerobic and anaerobic condition. Arch Microbiol, 127, 289-298.

SCHRYVERS A.B., STOJILJKOVIC I., (1999). Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. Mol Microbiol, 32, 1117-1123.

SCHWYN B., NEILANDS J.B., (1987). Universal chemical assay for the detection and

determination of siderophores. *Anal Biochem*, 160, 47-56.

SELANDER R.K., W.T.S., (1987). Genetic structure and variation in natural populations in *Escherichia coli* and p. p. 1625-1648. In N.F. e. coll (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington.

STUELAND C.S., GORDEN K., LAPORTE D.C., (1998). The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle. Identification of the primary rate-limiting step. *J Biol Chem*, 263, 19475-19479.

TENAILLON O., DENAMUR E., MATIC I., (2004). Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria *Trends Microbiol.* 12, 264-70.

TENAILLON O., SKURNIK D., PICARD B., DENAMUR E., (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 8, 207-217.

TORRES A.G., PAYNE S.M., (1997). Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* 23, 825-833.

TOUCHON M., HOEDE C., TENAILLON O., BARBE V., BAERISWYL S., BIDET P., BINGEN E., BONACORSI S., BOUCHIER C., BOUVET O., CALTEAU A., CHIAPELLO H., CLERMONT O., CRUVEILLER S., DANCHIN A., DIARD M., DOSSAT C., KAROUI M.E., FRAPY E., GARRY L., GHIGO J.M., GILLES A.M., JOHNSON J., LE BOUGUENEC C., LESCAT M., MANGENOT S., MARTINEZ-JEHANNE V., MATIC I., NASSIF X., OZTAS S., PETIT M.A., PICHON C., ROUY Z., RUF C.S., SCHNEIDER D., TOURRET J., VACHERIE B., VALLENET D., MEDIGUE C., ROCHA E.P., DENAMUR E., (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PloS Genet*, 5, e1000344.

TREVES D.S., MANNING S., ADAMS J., (1998). Repeated evolution of an acetate-crossfeeding polymorphism in long-term populations of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol*, 15, 789-797.

VAN DER WERF M.J., GUETTLER M.V., JAIN M.K., ZEIKUS J.G., (1997). Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus sp.* 130Z. *Arch Microbiol*, 167, 332-342.

VELAYUDHAN J., KELLY D.J., (2002). Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*, 148, 685-694.

WANG Q., ZHANG Y., YANG C., XIONG H., LIN Y., YAO J., LI H., XIE L., ET AL., (2010). Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 327, 1004-1007.

WATANABE H., WADA A., INAGAKI Y., ITOH K., TAMURA K., (1996). Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in

Japan, 1996. *Lancet*, 348, 831-832.

WOLF A.J., (2005). The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 12-50.

ZASLAVER A., MAYO A.E., ROSENBERG R., BASHKIN P., SBERRO H., TSALYUK M., SURETTE M.G., ALON U., (2004). Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nat Genet*, 36, 486-491.