



# Mécanismes moléculaires de l'adaptation au cours de 20 000 générations d'évolution expérimentale chez *Escherichia coli*.

Nadège Philippe

## ► To cite this version:

Nadège Philippe. Mécanismes moléculaires de l'adaptation au cours de 20 000 générations d'évolution expérimentale chez *Escherichia coli*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00108200

**HAL Id: tel-00108200**

**<https://theses.hal.science/tel-00108200>**

Submitted on 19 Oct 2006

**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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Nadège PHILIPPE**

Le 17 octobre 2006

---

**Mécanismes moléculaires de l'adaptation  
au cours de 20 000 générations d'évolution expérimentale  
chez *Escherichia coli***

---

Composition du jury

Dr Thierry VERNET	Président
Dr Didier MAZEL	Rapporteur
Pr Paul RITZENTHALER	Rapporteur
Dr Nicole COTTE-PATTAT	Examineur
Pr Dominique SCHNEIDER	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes

CNRS UMR5163

Institut Jean Roget

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier vivement Dominique Schneider de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir soutenue et guidée pendant ces 5 dernières années. Ce fut très enrichissant et motivant de travailler avec quelqu'un de si passionné par son sujet de recherche. Je le remercie également pour sa disponibilité. Malgré un emploi du temps plus que chargé, j'ai toujours pu compter sur son aide et son soutien au quotidien. Il n'a pas hésité à me pousser et m'encourager pour obtenir le meilleur et je l'en remercie également. Il a su élargir mes horizons scientifiques en me présentant des personnalités importantes de la recherche génétique procaryote (Michael Cashel, Richard Lenski, Charles Dorman, Tom Ferenci...). Enfin, je le remercie de m'avoir permis d'enseigner tout au long de ma thèse, j'ai découvert un domaine qui me plaît beaucoup.

Je remercie également Hans Geiselmann et Marie-France Cesbron-Delauw de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour les discussions enrichissantes que nous avons eues.

Je remercie tout particulièrement Michael Cashel de m'avoir enseigné avec énormément de gentillesse et de disponibilité les techniques d'étude de la réponse stringente et d'avoir fait le nécessaire pour m'accueillir pendant deux mois dans son laboratoire à Washington. Ce voyage fut très enrichissant aussi bien au niveau humain que scientifique. Ses conseils permanents pendant cette thèse ont été très importants, ainsi que toutes les souches et anticorps qu'il nous a envoyés.

Je remercie également Aurelia Battesti et Emmanuelle Bouveret pour leurs contributions au sujet de recherche sur la réponse stringente, Ludovic Pelosi pour son travail sur le sujet PBP et Estelle Crozat pour son travail sur le sujet topologie de l'ADN.

Je remercie les personnes que j'ai côtoyées au laboratoire. J'ai apprécié de connaître toutes les personnes travaillant dans les équipes étudiant la toxoplasmose, le prion et les bactéries. Merci notamment à Cécile Lelong pour ses encouragements et ses conseils pour la recherche de post-docs, Yves Markowicz pour ses connaissances en matière de métabolisme bactérien et son aide pour les enseignements. Merci beaucoup à Amel Latifi pour ses conseils, son aide précieuse lors de la préparation du DEA, et son soutien lors de ma recherche de post-doc. Merci à Mohamed-Ali Hakimi pour ses encouragements et son soutien dans ma recherche de post-doc, ainsi que pour ses conseils en matière de biochimie. Merci à Joël Gaffé pour sa gentillesse. Merci à Evelynne Coursange pour son accueil dans le laboratoire, sa gentillesse, son aide précieuse au quotidien. Merci infiniment pour sa présence dans les moments difficiles. C'est une perle et un cordon bleu !

Je remercie tous les amis que je me suis faits au cours de ces dernières années avec qui j'espère garder le contact : Alexandre Bougdour, quelqu'un de formidable, d'une gentillesse rare et passionné par son travail ; Sylvain Lemeille, avec qui on a beaucoup ri et qui m'a également beaucoup aidé dans les moments difficiles par sa disponibilité et ses conseils avisés ; Ludovic Pelosi, d'un grand secours en biochimie ; Dorian Guetta, Fanny Couppey, Sabine Schulz, et Jean-Philippe Didier, des stagiaires de choc ; Elizabeth Kay qui a accepté de prendre soin de mon papyrus offert gentiment par Edouard Boex-Fontvieille, un stagiaire (merci Edouard !) ; Estelle Crozat, Céline Boileau et Corinne Pinel, mes supers voisins de paillasse et confidentes avec qui j'ai passé de très bons moments.

Merci à Christiane Vella, Véronique Marques, Nicole Potier, Karine Musset et Nelly Reymond-Laruinaz pour leur aide précieuse et leur gentillesse.

Merci à Magali Hopquin, Nicole Kopczynski, Michèle Hamm pour leur efficacité et leur aide.

Merci à mes amis et ma famille (Audrey, Stéphanie, Adamo, Annie, ma sœur Kiki !, mes nièces, Christian, Evelynne et le petit Johann, ma petite maman, mon papa et Diane...) pour leur soutien et leur patience.

Merci à tous ceux que j'ai oublié de remercier !

# Table des matieres

Avant propos.....	1
-------------------	---

## INTRODUCTION

<b>I. Le cycle cellulaire d'<i>Escherichia coli</i></b> .....	4
<b>II. <i>Escherichia coli</i> et l'adaptation aux transitions nutritionnelles</b> .....	7
<b>II.1. L'enveloppe cellulaire face aux conditions environnementales</b> .....	7
II.1.1. La membrane externe.....	7
II.1.1.1. Structure de la membrane externe.....	7
II.1.1.2. Structure de la membrane externe en fonction des conditions de croissance	9
II.1.2. Le peptidoglycane.....	11
II.1.2.1. Structure du peptidoglycane.....	11
II.1.2.2. Biosynthèse du peptidoglycane.....	11
II.1.2.3. Métabolisme du peptidoglycane en fonction des conditions de croissance..	13
II.1.3. La membrane cytoplasmique.....	17
II.1.3.1. Composition.....	17
II.1.3.2. Remaniements de la membrane plasmique en fonction des conditions de	
croissance.....	18
<b>II.2. La composition macromoléculaire des cellules (ADN, ARN, protéines)</b> .....	19
II.2.1. Composition des cellules en phase de croissance exponentielle.....	20
II.2.2. La composition cellulaire lors du passage en phase stationnaire.....	21
<b>II.3. L'expression globale des gènes en fonction des conditions de croissance</b> .....	23
<b>III. La réponse stringente</b> .....	27
<b>III.1. Historique</b> .....	27
<b>III.2. Les acteurs de la réponse stringente</b> .....	29
III.2.1. Le métabolisme de (p)ppGpp.....	29
III.2.2. RelA.....	30
III.2.2.1. RelA et la synthèse de (p)ppGpp.....	30
III.2.2.2. Caractérisation fonctionnelle de RelA.....	30
III.2.3. SpoT.....	31
III.2.3.1. SpoT et le métabolisme de (p)ppGpp.....	31
III.2.3.2. Caractérisation fonctionnelle de SpoT.....	33
III.2.3.3. Interactions protéiques impliquant SpoT.....	34
III.2.4. Les homologues Rel/Spo.....	35
III.2.5. DksA.....	37
<b>III.3. (p)ppGpp et la régulation de l'expression des gènes</b> .....	38
III.3.1. Etude des mutants dépourvus de (p)ppGpp.....	40
III.3.2. Le contrôle stringent négatif .....	40
III.3.3. Le contrôle stringent positif.....	41
III.3.3.1. Activation de la transcription par (p)ppGpp : le modèle passif.....	41
III.3.3.2. Activation de la transcription par (p)ppGpp : modèle actif.....	42
III.3.4. Mécanisme d'action de (p)ppGpp : interaction avec	
l'ARN polymérase.....	44
III.3.4.1. Liaison de (p)ppGpp à l'ARN polymérase.....	44
III.3.4.2. Rôle des protéines DksA et GreA.....	45
<b>III.4. Ubiquité de la réponse stringente</b> .....	46
<b>IV. La topologie de l'ADN</b> .....	47
<b>IV.1. Les acteurs de la topologie de l'ADN</b> .....	47



IV.1.1. Les topoisomérases.....	48
IV.1.2. Les protéines associées au nucléoïde.....	48
IV.1.3. Organisation du chromosome en domaines topologiques.....	50
IV.1.4. La régulation homéostatique de la superhélicité.....	51
<b>IV.2. Topologie de l'ADN et expression des gènes.....</b>	<b>52</b>
<b>IV.3. Fluctuations de l'environnement et superhélicité de l'ADN.....</b>	<b>53</b>
<b>IV.4. La topologie de l'ADN et la réponse stringente : 2 réseaux intimement connectés.....</b>	<b>54</b>
<b>V. La stratégie d'évolution expérimentale.....</b>	<b>58</b>
<b>V.1. Le système expérimental.....</b>	<b>58</b>
<b>V.2. Evolution phénotypique des douze populations : parallélisme de l'évolution.....</b>	<b>59</b>
V.2.1. Augmentation du fitness (capacité de reproduction).....	59
V.2.2. Morphologie des cellules et cycle de croissance.....	60
V.2.3. Capacités métaboliques.....	61
V.2.4. Modifications parallèles de l'expression des gènes.....	62
<b>V.3. Evolution génotypique : les IS comme marqueurs génomiques.....</b>	<b>63</b>
<b>V.4. Evolution génétique : identification de mutations bénéfiques.....</b>	<b>64</b>
V.4.1. Mutations liées aux mouvements d'IS.....	64
V.4.2. Analyses moléculaires des modifications phénotypiques.....	66
V.4.3. Objectifs.....	67

## RESULTATS

<b>I. Etude de mutations par construction de souches isogéniques au moyen de plasmides-suicide.....</b>	<b>69</b>
<b>Article</b> : Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. Philippe N., Alcaraz J.P., Coursange E., Donnenberg M., Geiselmann J. and Schneider D, 2004, Plasmid 51 : 246-255.	
<b>II. La réponse stringente et l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale.....</b>	<b>72</b>
<b>II.1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>73</b>
II.1.1. Matériel.....	73
II.1.1.1. Souches bactériennes.....	73
II.1.1.2. Plasmides.....	75
II.1.1.3. Oligonucléotides.....	76
II.1.1.4. Milieux de culture.....	77
II.1.2. Méthodes.....	79
II.1.2.1. Techniques classiques de biologie moléculaire et génétique.....	79
II.1.2.2. Construction de mutants au moyen du plasmide-suicide pKO3.....	80
II.1.2.3. Détermination du fitness des bactéries : expériences de compétition.....	81
II.1.2.4. Transduction généralisée par le bactériophage P1.....	82
II.1.2.5. Infection par le bactériophage $\lambda$ .....	83
II.1.2.6. Mesures de concentrations d'ARN, ADN et protéines.....	84
II.1.2.7. Mesures d'activités $\beta$ -galactosidase.....	85
II.1.2.8. Etude du métabolisme de (p)ppGpp.....	86
II.1.2.9. Western-blots.....	87
II.1.2.10. Etude de la stabilité de RpoS.....	89
II.1.2.11. Purification de sous-unités ribosomiques 50S.....	89
II.1.2.12. Immobilisation des ribosomes et tests d'interactions protéiques.....	90
II.1.2.13. Clonages et purifications de SpoT et CgtA.....	91
II.1.2.14. Tests d'interactions protéiques par double-hybride bactérien.....	92
II.1.2.15. Tests d'interactions protéiques par double-hybride de levure.....	92

<b>II.2. Effets physiologiques des mutations du gène <i>spoT</i></b>	93
II.2.1. Construction de souches ancestrales isogéniques, excepté pour le gène <i>spoT</i>	93
II.2.2. Dynamique d'invasion des mutations <i>spoT</i>	94
II.2.3. Effets des mutations <i>spoT</i> sur le fitness des bactéries dans le milieu de l'évolution	94
II.2.4. Effets des mutations <i>spoT</i> sur la croissance bactérienne en DM25 glucose	97
II.2.5. Effets des mutations <i>spoT</i> sur la croissance bactérienne dans d'autres environnements	98
<b>II.3. Effets des mutations <i>spoT</i> sur le métabolisme de (p)ppGpp et l'expression de ses gènes cibles</b>	101
II.3.1. Effets des mutations <i>spoT</i> sur le métabolisme de (p)ppGpp	101
II.3.1.1. Tests phénotypiques	101
II.3.1.2. Activités de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp	103
II.3.1.3. Métabolisme de (p)ppGpp au cours de la croissance	104
II.3.2. Bénéfice apporté par les mutations <i>spoT</i> en quasi-absence de (p)ppGpp	105
II.3.3. Effets des mutations <i>spoT</i> sur l'expression d'un gène cible régulé positivement par (p)ppGpp : <i>rpoS</i>	106
II.3.4. Effets des mutations <i>spoT</i> sur la composition cellulaire en ADN, ARN et protéines	110
<b>II.4. Effets de la mutation <i>spoT</i> de la population Ara-1 sur la transcription globale</b>	112
<b>II.5. Effets des mutations <i>spoT</i> sur les interactions SpoT-ACP et SpoT-CgtA</b>	117
<b>II.6. Participation des mutations <i>spoT</i> à l'évolution des bactéries</b>	120
<b>II.7. Discussion</b>	122
<b>Manuscrit : Global regulatory networks plasticity during experimental evolution in <i>E. coli</i>.</b>	
Philippe N., Crozat E., Lenski R.E. and Schneider D. BioEssays.	
<b>III. Analyse de mutations du gène <i>pbpA</i> sélectionnées au cours de l'évolution</b>	128
<b>III.1. Matériel et méthodes</b>	129
III.1.1. Matériel	129
III.1.1.1. Souches bactériennes	129
III.1.1.2. Plasmides	130
III.1.1.3. Oligonucléotides	130
III.1.1.4. Milieux de culture	130
III.1.2. Méthodes	131
III.1.2.1. Techniques classiques de biologie moléculaire et génétique	131
III.1.2.2. Construction de mutants au moyen du plasmide-suicide pKO3	131
III.1.2.3. Détermination du fitness des bactéries : expériences de compétition	131
III.1.2.4. Evaluation de la résistance des souches au mécilinam	132
III.1.2.5. Evaluation de la résistance des souches au stress osmotique	132
III.1.2.6. Effets des mutations <i>pbpA</i> sur la morphologie cellulaire	132
III.1.2.7. Construction des fusions transcriptionnelles <i>PpbpA-lacZ</i>	133
III.1.2.8. Préparation de protéines membranaires	134
III.1.2.9. Détection des PBP par Western-blot	134
<b>III.2. Effets des mutations de l'opéron <i>pbpA-rodA</i> sur l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale</b>	135
III.2.1. Dynamique d'invasion des mutations <i>pbpA</i> <sup>-5</sup> et <i>pbpA</i> <sup>+1</sup>	135
III.2.2. Construction de souches isogéniques, excepté pour l'allèle <i>pbpA</i>	136
III.2.3. Effets des mutations <i>pbpA</i> sur le fitness des bactéries	137
<b>III.3. Effets des mutations de l'opéron <i>pbpA-rodA</i> sur la morphologie cellulaire</b>	138

III.4. Effets des mutations de l'opéron <i>pbpA-rodA</i> sur l'expression de <i>pbpA</i> .....	140
III.5. Effets des mutations de l'opéron <i>pbpA-rodA</i> sur la résistance des bactéries au mécillinam.....	142
III.6. Effets des mutations de l'opéron <i>pbpA-rodA</i> sur la résistance des bactéries au stress osmotique.....	143
III.7. Discussion.....	144
 IV. Influence de la topologie de l'ADN sur l'adaptation des bactéries à leur environnement.....	147
<b>Article</b> : Long-term experimental evolution in <i>Escherichia coli</i> . XII. DNA topology as a key target of selection. Estelle Crozat, Nadège Philippe, Richard E. Lenski, Johannes Geiselmann and Dominique Schneider, 2005, Genetics, (169) : 523-532.	
 DISCUSSION GENERALE.....	151
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	160

# Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Courbe de croissance d' <i>Escherichia coli</i> cultivée en culture discontinue.....	4
<b>Figure 2</b> : Le cycle cellulaire d' <i>E. coli</i> et les modifications physiologiques et morphologiques lui permettant de s'adapter à la phase stationnaire.....	5
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries Gram-.....	7
<b>Figure 4</b> : Structure et composition du peptidoglycane.....	11
<b>Figure 5</b> : Polymérisation et réticulation des chaînes de glycane grâce aux PBPs.....	12
<b>Figure 6</b> : Modèle « 3 pour 1 » de synthèse de peptidoglycane.....	13
<b>Figure 7</b> : Schéma représentant l'hypothèse selon laquelle le complexe MreBCD interagirait avec les protéines impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane lors de l'élongation.....	14
<b>Figure 8</b> : Relations entre taux de croissance, taille des cellules, transcription globale et composition cellulaire chez <i>E. coli</i> B/r en phase de croissance exponentielle.....	20
<b>Figure 9</b> : Composition de l'ARN polymérase holoenzyme et des protéines associées au nucléoïde durant le cycle de croissance d' <i>E. coli</i> .....	23
<b>Figure 10</b> : Constitution de l'ARN polymérase selon les conditions de croissance.....	24
<b>Figure 11</b> : Métabolisme de (p)ppGpp.....	29
<b>Figure 12</b> : Mécanisme de synthèse de (p)ppGpp par RelA associée aux ribosomes.....	30
<b>Figure 13</b> : Organisation des protéines RelA, SpoT et de leurs homologues bifonctionnels identifiés chez les bactéries et les plantes.....	31
<b>Figure 14</b> : Modèle de régulation réciproque des activités catalytiques de Rel <sub>seq</sub> par interaction des domaines N et C-terminal.....	36
<b>Figure 15</b> : Transmission du signal du site hydrolytique au site de synthèse de (p)ppGpp dans le domaine N- terminal de Rel <sub>seq</sub> (aa 1-385).....	36
<b>Figure 16</b> : Structures de DksA et de GreA .....	37
<b>Figure 17</b> : Effets de (p)ppGpp sur l'expression globale des gènes.....	38
<b>Figure 18</b> : Régulation de la transcription globale par ppGpp.....	42
<b>Figure 19</b> : Modèle cristallographique de l'association de ppGpp selon deux orientations distinctes au canal secondaire de l'ARN polymérase.....	44
<b>Figure 20</b> : Modèle du complexe ternaire ARN polymérase-ppGpp-DksA.....	45
<b>Figure 21</b> : Changements de composition et de conformation du nucléoïde en fonction de la phase de croissance d' <i>E. coli</i> W3110.....	48
<b>Figure 22</b> : Régulation de l'homéostasie de la topologie de l'ADN grâce aux topoisomérases et aux régulateurs transcriptionnels Fis, ppGpp et CRP.....	49
<b>Figure 23</b> : Représentation schématique de l'organisation en macrodomaïnes du chromosome d' <i>E. coli</i> .....	50
<b>Figure 24</b> : Modèle de régulation de la superhélicité négative de l'ADN lors d'un stress oxydatif et conséquences sur l'expression des gènes.....	52
<b>Figure 25</b> : Principe des expériences de compétition, destinées à mesurer le fitness des clones évolués.....	59
<b>Figure 26</b> : Evolution parallèle du fitness chez les clones évolués par rapport à l'ancêtre.....	60
<b>Figure 27</b> : Evolution parallèle du volume et de la morphologie cellulaires.....	60
<b>Figure 28</b> : Evolution du volume et du nombre de cellules par rapport à l'ancêtre à la fin d'un cycle de culture de 24h.....	61
<b>Figure 29</b> : Représentation de la protéine SpoT et localisation des mutations mises en évidence dans 8 des 12 populations issues de l'évolution expérimentale.....	66
<b>Figure 30</b> : Effets des mutations du gène <i>spoT</i> sur le fitness des bactéries dans le contexte génétique de l'ancêtre.....	96
<b>Figure 31</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur le fitness des bactéries en fonction des phases de croissance.....	96
<b>Figure 32</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur le fitness des bactéries lors d'une expérience d'évolution au cours de laquelle les bactéries rencontrent une phase stationnaire prolongée (DM25 glucose).....	97
<b>Figure 33</b> : Caractéristiques de croissance des souches porteuses des allèles ancestraux et évolués de <i>spoT</i> en DM25 glucose, le milieu de l'évolution.....	98
<b>Figure 34</b> : Effet de la mutation <i>spoT</i> de la population Ara+2 sur le fitness des bactéries en DM25 glycérol selon les phases de croissance.....	100
<b>Figure 35</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur le métabolisme de (p)ppGpp : tests de résistance à l'accumulation de (p)ppGpp.....	102
<b>Figure 36</b> : Mesures des taux de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp par création d'une carence artificielle en sérine au moyen de sérine hydroxamate (inhibiteur de la seryl-tRNA synthétase).....	103
<b>Figure 37</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur le métabolisme de (p)ppGpp.....	104

<b>Figure 38</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur le métabolisme de (p)ppGpp. Evolution du niveau de (p)ppGpp dans les souches <i>spoT<sup>anc</sup></i> et <i>spoT<sup>évol</sup></i> au cours de la croissance bactérienne dans le milieu minimum MOPS glucose.....	105
<b>Figure 39</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur l'expression de RpoS.....	107
<b>Figure 40</b> : Fusions transcriptionnelles et traductionnelles <i>rpos-lacZ</i> utilisées dans cette étude .....	108
<b>Figure 41</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur la composition en ADN, ARN et protéines des cellules cultivées en milieu DM250 glucose.....	110
<b>Figure 42</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur la composition en ADN, ARN et protéines des cellules cultivées en milieu MOPS glucose.....	111
<b>Figure 43</b> : Effets de la mutation bénéfique <i>topA</i> , apparue dans la population Ara-1, sur la composition en ADN, ARN et protéines de cellules cultivées en milieu DM250 glucose.....	112
<b>Figure 44</b> : Principe de l'expérience de double hybride bactérien (Karimova <i>et al.</i> , 1998), permettant de mesurer les interactions entre deux protéines.....	117
<b>Figure 45</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur l'interaction de SpoT avec ACP, évaluée par des expériences de double hybride bactérien.....	118
<b>Figure 46</b> : Principe des tests d'interactions entre SpoT, CgtA et les sous-unités 50S des ribosomes.....	119
<b>Figure 47</b> : Evolution de la composition en ADN, ARN et protéines des cellules cultivées en DM250 glucose....	121
<b>Figure 48</b> : Mutations identifiées dans l'opéron <i>pbpA-rodA</i> dans les populations évoluées.....	129
<b>Figure 49</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> des populations Ara-5 et Ara+1 sur le fitness des bactéries.....	137
<b>Figure 50</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> des populations Ara-5 et Ara+1 sur la morphologie cellulaire.....	138
<b>Figure 51</b> : Effets de la mutation <i>pbpA</i> de la population Ara+1 sur le volume cellulaire.....	138
<b>Figure 52</b> : Effets de l'inhibition de l'activité enzymatique de la protéine PBP2 par le mécillina sur la morphologie cellulaire.....	139
<b>Figure 53</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> des populations Ara-5 et Ara+1 sur la morphologie des colonies.....	139
<b>Figure 54</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> des populations Ara-5 et Ara+1 sur l'expression de la protéine PBP2.....	141
<b>Figure 55</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> identifiées dans les populations Ara-5 et Ara+1 sur la résistance des bactéries au stress osmotique.....	144
<b>Figure 56</b> : Mécanismes moléculaires adaptatifs.....	155
<b>Tableau 1</b> : Le régulon de (p)ppGpp.....	39
<b>Tableau 2</b> : Résumé des mutations découvertes dans les clones évolués.....	65
<b>Tableau 3</b> : Temps de génération de l'ancêtre 606 <i>spoT<sup>anc</sup></i> et des souches 606 <i>spoT<sup>évol</sup></i> mesurés en phase de croissance exponentielle en DM25 glucose (2 <sup>ème</sup> colonne).....	99
<b>Tableau 4</b> : Fitness relatif de l'ancêtre 606 portant l'allèle ancestral ou chacun des trois allèles évolués de <i>spoT</i> par rapport à l'ancêtre 607 mesuré dans différents milieux de culture.....	99
<b>Tableau 5</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur le métabolisme de (p)ppGpp : tests phénotypiques de croissance des souches <i>relA<sup>+</sup></i> et $\Delta$ <i>relA</i> portant les allèles <i>spoT</i> ancestral et évolués.....	101
<b>Tableau 6</b> : Fitness relatif de l'ancêtre 606 <i>relA<sup>+</sup></i> ou $\Delta$ <i>relA</i> portant les allèles ancestral ou évolués de <i>spoT</i> par rapport à l'ancêtre 607, mesuré en DM25 glucose au bout de 24h de compétition. ....	106
<b>Tableau 7</b> : Effets des mutations <i>spoT</i> sur l'expression de <i>rpoS</i> .....	109
<b>Tableau 8</b> : Effets de la mutation <i>spoT</i> de la population Ara-1 sur la transcription globale des gènes.....	114
<b>Tableau 9</b> : Dynamique d'invasion des mutations <i>pbpA</i> dans les populations Ara+1 et Ara-5.....	135
<b>Tableau 10</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> identifiées dans les populations Ara-5 et Ara+1 sur l'activité du promoteur de l'opéron <i>pbpA-rodA</i> .....	140
<b>Tableau 11</b> : Effets des mutations <i>pbpA</i> identifiées dans les populations Ara-5 et Ara+1 sur la résistance des bactéries au mécillina.....	143

## Glossaire - Abréviations

---

**aa** : acides aminés  
**Ac** : anticorps  
**ACP** : protéine transporteur d'acyl  
**AD** : domaine d'activation de la transcription  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AMPc** : adénosine monophosphate cyclique  
**Amp<sup>R</sup>** : résistance à l'ampicilline  
**Ara+ ou -** : capacité ou incapacité à utiliser l'arabinose comme source de carbone  
**ARNm** : ARN messenger  
**ARNr** : ARN ribosomique  
**ARNt** : ARN de transfert  
**AT** : aminotriazole  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**Cm<sup>R</sup>** : résistance au chloramphénicol  
**CTD** : domaine C-terminal  
**DBD** : domaine de liaison à l'ADN  
**DMSO** : diméthyl sulfoxyde  
**DPG** : diphosphatidylglycérol (cardiolipine)  
**DTT** : dithiothréitol  
**GASP** : avantage de croissance en phase stationnaire  
**GDP** : guanosine diphosphate  
**GlcNac** : *N*-acétyl glucosamine  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**HA** : hémagglutinine  
**IPTG** : isothiopropyl β-D-galactoside  
**IS** : séquence d'insertion  
**Kb** : kilo paire de base  
**Kda** : kilodalton  
**LPS** : lipopolysaccharides  
**MurNac** : acide *N*-acétylmuramique  
**NAG** : *N*-acétylglucosamine  
**NAM** : acide *N*-acétylmuramique  
**NBT-BCIP** : chlorure de tétrazolium nitro-bleu – sel de 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine  
**NTD** : domaine N-terminal  
**NTPi** : nucléosides triphosphate d'initiation de la transcription  
**NTP** : nucléosides triphosphate  
**Pb** : paire de base  
**PBP** : protéine liant la pénicilline  
**PE** : phosphatidyléthanolamine  
**PEG** : polyéthylène glycol  
**PG** : phosphatidylglycérol  
**ppGpp** : guanosine tétraphosphate  
**pppGpp** : guanosine pentaphosphate  
**(p)ppGpp** : guanosine penta- et tétraphosphate  
**PTS** : système phosphotransférase des sucres  
**RBS** : site de liaison des ribosomes

**RFLP** : polymorphisme de longueur de fragments de restriction

**TAP-Tag** : purification par affinité en tandem

**UDP** : uridine diphosphate

**UFC** : unité formatrice de colonie

**X-gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside.

## Définitions

---

**Fitness** : capacité de reproduction d'une souche, valeur adaptative.

**Fixation** : une mutation bénéfique est dite « fixée » lorsqu'elle est portée par tous les individus composant la population à un temps donné.

**Interférence clonale** : phénomène observé lorsqu'une population est composée de plusieurs sous-populations cellulaires portant des mutations différentes qui apportent un avantage équivalent. Les sous-populations coexistent, empêchant la fixation rapide d'une des mutations bénéfiques. Lorsqu'une mutation bénéfique supplémentaire apparaît dans une des sous-populations, celle-ci devient majoritaire ainsi que les mutations qu'elle porte. Ce phénomène ralentit donc la fixation de mutations bénéfiques.

**Pleiotropie antagoniste** : il s'agit d'un mécanisme conduisant à la spécialisation écologique. Une mutation, sélectionnée pour le bénéfice qu'elle apporte dans l'environnement de sélection, peut avoir des effets néfastes dans d'autres environnements. Elle a alors des effets pleiotropes (c'est-à-dire multiples) antagonistes.

**Accumulation de mutations** : il s'agit d'un autre mécanisme conduisant à la spécialisation écologique. Au cours de l'évolution, des mutations neutres, voire faiblement délétères dans l'environnement de sélection peuvent s'accumuler dans des gènes non soumis à la sélection naturelle.

**Spécialisation écologique** : au cours de l'évolution, des fonctions inutiles dans l'environnement de sélection peuvent être perdues ou réduites suite aux phénomènes d'accumulation de mutations ou de pleiotropie antagoniste. Les bactéries sont alors spécialisées pour leur environnement de sélection, et inadaptées à d'autres environnements nécessitant la présence des fonctions éliminées ou réduites au cours de l'évolution.

## Avant propos

---

Dans leur environnement naturel, les bactéries sont constamment soumises à une alternance entre des conditions favorables à leur croissance et des conditions de stress ou de carences nutritionnelles auxquelles elles doivent rapidement s'adapter pour survivre. Phénotypiquement, cette adaptation peut se manifester de diverses façons. Certaines bactéries ont développé des processus de différenciation morphologique, résultant en des formes cellulaires non répliquatives et adaptées aux conditions environnementales rigoureuses. En réponse à des carences, les espèces bactériennes telles que *Bacillus* ou *Clostridium* (Errington, 2003 ; Paredes *et al.*, 2005) se différencient et forment des endospores. D'autres espèces, telles que *Caulobacter crescentus* ou *Myxococcus xanthus*, s'adaptent en formant des structures différenciées particulières appelées corps fructifiants, formées de l'aggrégation de spores. Lorsque les conditions s'améliorent, ces cellules différenciées subissent une étape de germination et les individus peuvent à nouveau se diviser de façon végétative. D'autre part, certaines espèces d'entérobactéries, telles qu'*Escherichia coli*, présentent des modifications morphologiques et physiologiques en période de carences, telles qu'une diminution du volume cellulaire et une compaction du nucleoïde, sans toutefois se différencier (Huisman *et al.*, 1996). Ces changements s'accompagnent d'une résistance accrue aux stress. Certains pathogènes bactériens, tels que *Legionella pneumophila*, alternent entre deux états phénotypiques différents. Lorsqu'ils sont soumis à des conditions défavorables, ils passent d'une forme végétative non infectieuse à une forme non répliquative, infectieuse, et résistante aux stress, qui favorise la transmission vers un nouvel hôte (Swanson et Hammer, 2000 ; Moulder, 1985).

Les bactéries sont donc capables de détecter les fluctuations de l'environnement et d'y répondre de façon adaptée par des changements phénotypiques importants et variés, qui résultent de modifications de l'expression globale de leurs gènes (McAdams *et al.*, 2004). Un certain nombre de régulateurs transcriptionnels permettent d'ajuster l'expression des gènes aux conditions environnementales. Plusieurs niveaux de régulation de l'expression des gènes existent dans les cellules. Certains régulateurs sont capables de réguler un nombre de gènes limité, par exemple un ou plusieurs opéron(s), ou un ensemble de gènes plus important (régulon) en réponse à des conditions précises. D'autres régulateurs interviennent à un niveau plus élevé en intégrant une multitude de signaux et en ajustant l'expression de nombreux gènes. L'interconnection de ces régulateurs aboutit à la formation de réseaux de régulation

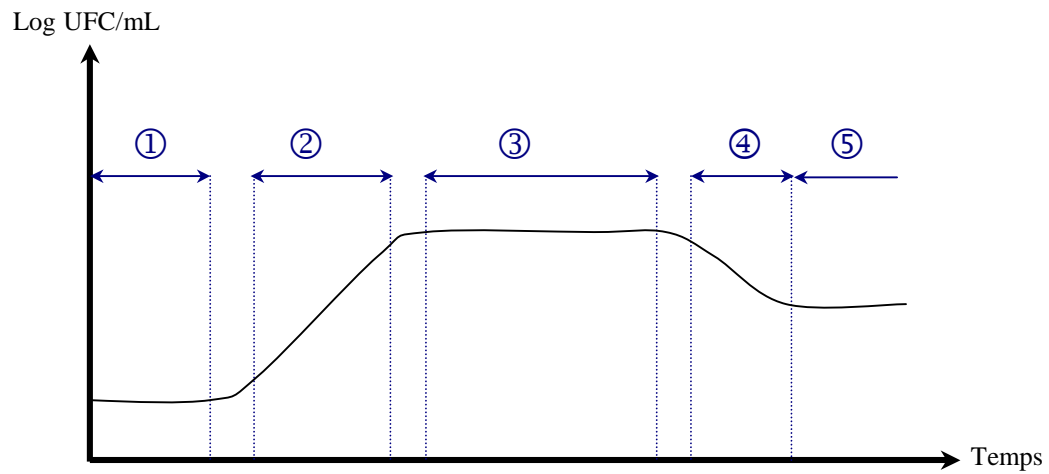


complexes qui modulent l'expression d'une proportion importante des gènes. Deux réseaux de régulation globale majeurs et très conservés jouent un rôle clé dans l'adaptation des bactéries aux fluctuations de l'environnement. D'une part, la réponse stringente permet de réorganiser la transcription globale des gènes grâce à un nucléotide effecteur ou alarmone : (p)ppGpp, en réponse à différentes conditions de carence (Cashel *et al.*, 1996). D'autre part, la topologie de l'ADN joue un rôle important en permettant la transcription sélective des gènes selon les conditions de croissance (Hatfield et Benham, 2002 ; Weinstein-Fischer *et al.*, 2002). Ces deux réseaux permettent de détecter une multitude de conditions de stress (alternances croissance-carence, température, pH, stress osmotique, stress oxydatif) et d'ajuster l'expression des gènes afin d'optimiser la réponse cellulaire.

Pour comprendre les processus d'adaptation à une alternance entre des conditions favorables et défavorables à la croissance, il est essentiel d'étudier la dynamique des réseaux de régulation globale. Une des façons d'atteindre cet objectif est d'utiliser une stratégie d'évolution expérimentale, consistant à faire évoluer des bactéries pendant des milliers de générations dans un environnement contrôlé, comprenant par exemple une alternance entre des conditions de croissance et de carence. Nous avons choisi de nous baser sur une stratégie initiée par Richard Lenski en 1988. Douze populations indépendantes d'*Escherichia coli* ont été propagées à partir d'un ancêtre commun dans un milieu constant renouvelé quotidiennement (Lenski et Travisano, 1994). Les bactéries rencontrent donc tous les jours depuis 1988 une phase de latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle, et d'une phase stationnaire lorsque les nutriments (ici le glucose) s'épuisent. Nous disposons aujourd'hui de plus de 40 000 générations d'évolution expérimentale. Ce type de stratégie permet de disposer à la fois du clone ancêtre fondateur et des intermédiaires d'évolution, par cryoconservation. Il est alors possible de comparer les clones évolués à leur ancêtre et d'évaluer les modifications génotypiques et phénotypiques impliquées dans les processus adaptatifs.

Dans une première partie, l'introduction bibliographique présentera les changements phénotypiques rencontrés par *E. coli* lors des transitions nutritionnelles, puis les contrôles génétiques majeurs connus pour être impliqués dans ces phénomènes. Enfin, la stratégie d'évolution expérimentale sera présentée. L'objectif de ma thèse consiste à déterminer les bases génétiques de l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale, faites de transitions journalières entre des conditions de croissance et de carence. Nous tenterons de répondre à plusieurs questions. D'une part, quels types de gènes

sont les cibles de la sélection naturelle dans de telles conditions ? Des mutations bénéfiques sont-elles préférentiellement sélectionnées dans les gènes codant des régulateurs de l'expression des gènes ou des protéines de structure ? En d'autres termes, les réseaux de régulation globale sont-ils modifiés durant l'évolution ? Si oui, quelles répercussions cela a-t-il au niveau phénotypique ? Enfin, observe-t-on les mêmes modifications génotypiques et phénotypiques au sein des douze populations ?



**Figure 1 : Courbe de croissance d'*Escherichia coli* cultivée en culture discontinue.** La courbe de croissance d'*E. coli* comporte 5 phases distinctes :

- ① : Phase de latence ; ② : Phase de croissance exponentielle ; ③ : Phase stationnaire ; ④ : Phase de déclin ;
- ⑤ : Phase stationnaire prolongée.

## I. Le cycle cellulaire d'*Escherichia coli*

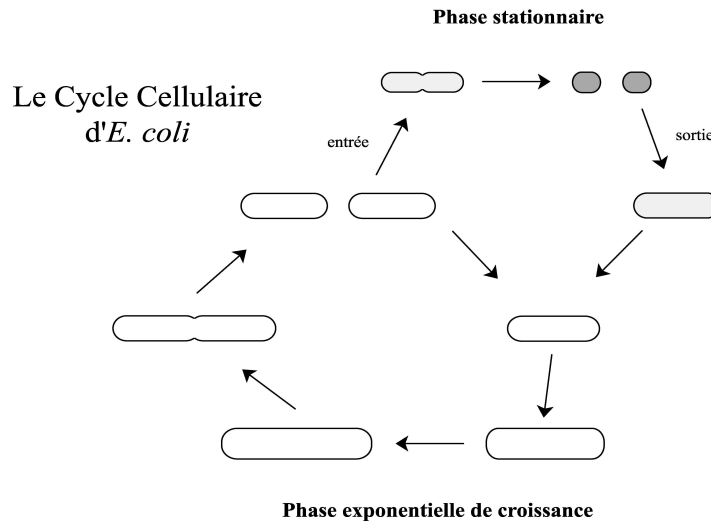
---

En laboratoire, les bactéries sont majoritairement cultivées de deux façons. D'une part, les cellules peuvent être cultivées en chémostat, c'est-à-dire en système continu (Novick et Szilard, 1950), la composition du milieu de culture restant constante. D'autre part, les bactéries peuvent être cultivées en système discontinu, c'est-à-dire en système fermé, sans apport de milieu frais au cours de l'incubation. La quantité d'éléments nutritifs diminue donc au cours de la croissance tandis que la concentration des déchets métaboliques (acétate...) augmente. Les bactéries sont alors soumises à des transitions entre des phases de croissance et de carence nutritionnelle. Les cellules peuvent être maintenues dans un même milieu de culture non renouvelé pendant plusieurs semaines, elles subissent alors des carences prolongées. Les bactéries cultivées en système discontinu présentent une croissance qui peut être décomposée en 5 phases (Fig.1).

Lorsqu'un inoculum d'*E. coli* est introduit dans du milieu frais, les cellules doivent s'adapter aux nouvelles conditions et ne se divisent pas ou peu : c'est la phase de latence (Fig.1). La durée de cette phase varie selon plusieurs facteurs, par exemple, l'état physiologique des bactéries. Un inoculum constitué de bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire est dans un état physiologique peu favorable, les cellules doivent entre autres renouveler leur stock de ribosomes pour que les processus de biosynthèse puissent à nouveau s'établir. La composition du milieu est également déterminante. Un inoculum prélevé en phase de croissance exponentielle et introduit dans un milieu de composition différente présente une phase de latence plus longue. En effet, les cellules doivent d'abord synthétiser les enzymes nécessaires à l'utilisation des nouveaux substrats avant de pouvoir se diviser activement. Une augmentation de la superhélicité de l'ADN joue un rôle important dans la sortie de cette phase en permettant l'expression de gènes spécifiques de la phase de croissance exponentielle (Westerhoff *et al.*, 1988 ; Kusano *et al.*, 1996).

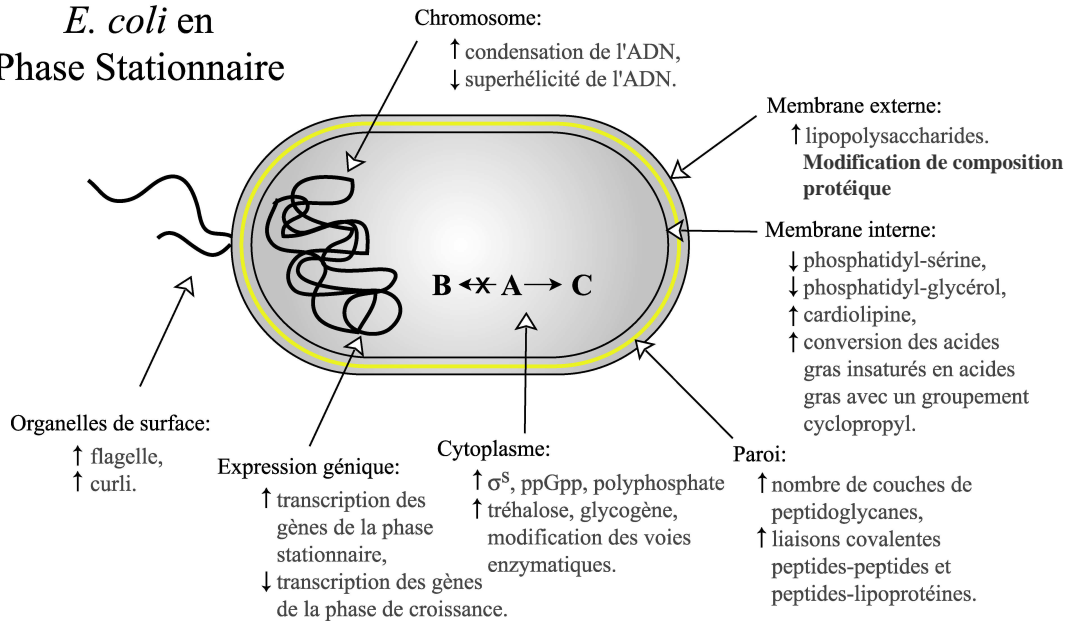
A la phase de latence succède une seconde phase d'accélération au cours de laquelle la concentration cellulaire augmente de façon importante. Le taux de croissance s'accroît régulièrement jusqu'à atteindre un maximum. On parle alors de phase logarithmique ou de croissance exponentielle qui correspond à une vitesse de division constante et maximale (Fishov *et al.*, 1995) (Figs.1 et 2). Le temps de doublement atteint une valeur minimale,

A)



B)

*E. coli* en Phase Stationnaire



**Figure 2 : A) Le cycle cellulaire d'*E. coli* (d'après Kolter, 1993).** Le cycle cellulaire d'*E. coli* est caractérisé par l'alternance de conditions de croissance optimale et de carences nutritionnelles. Lorsque les conditions sont favorables, les bactéries se divisent de façon exponentielle, ce qui aboutit à l'épuisement du milieu de culture. Les bactéries rencontrent alors des déficiences nutritionnelles et entrent en phase stationnaire. Pendant cette transition, elles subissent un certain nombre de **modifications physiologiques et morphologiques qui leur permettent de s'adapter à la phase stationnaire** (B) (d'après Vicente, 1999).

↑ symbolise une augmentation, ↓ symbolise une diminution.

d'environ 20 min pour *E. coli* cultivée en milieu riche à 37°C. Le contenu cellulaire est très riche en ribosomes afin de satisfaire à la synthèse protéique.

A la fin de cette phase de croissance optimale, le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance. Alors que la concentration cellulaire a fortement augmenté, les métabolites toxiques (par exemple l'acétate) s'accumulent et les nutriments s'épuisent. Le nombre de cellules viables et cultivables (UFC) reste constant, on parle de phase stationnaire (Figs.1 et 2). Elle correspond à un équilibre entre le nombre de cellules provenant de la multiplication et le nombre de cellules qui disparaissent par autolyse. Cette phase est caractérisée par une forte diminution, voire une annulation, du taux de croissance. Lors de l'entrée en phase stationnaire, la concentration en ARN stables et en ribosomes diminue de façon conséquente. Les bactéries deviennent plus résistantes aux stress et présentent un certain nombre de changements phénotypiques et morphologiques (Fig.2). Tous ces changements sont sous contrôle de régulateurs globaux, tel que (p)ppGpp, l'effecteur de la réponse stringente qui permet l'adaptation des bactéries aux carences nutritionnelles. La topologie de l'ADN et l'intervention de facteurs  $\sigma$  alternatifs jouent également un rôle primordial, en réorientant la transcription globale vers des gènes impliqués dans la résistance aux stress.

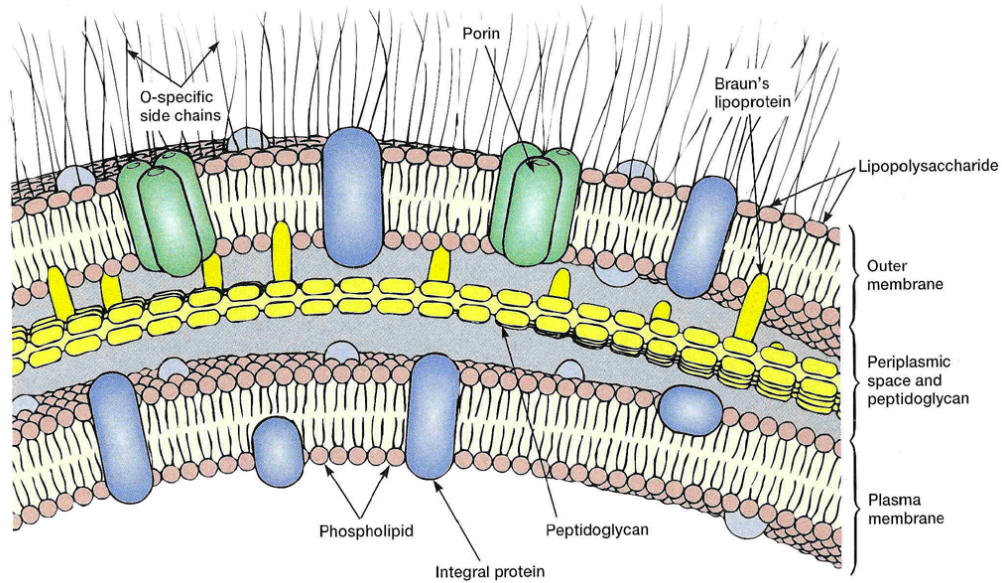
Après la phase stationnaire, les bactéries présentent une phase de déclin (Fig.1) au cours de laquelle 99% des cellules meurent et sont lysées par les enzymes qu'elles libèrent, les autolysines (Finkel, 2006). Ceci provoque la libération d'acides aminés, d'hydrates de carbone, de lipides et d'ADN pouvant être utilisés par les cellules survivantes (Finkel, 2006 ; Finkel et Kolter, 2001 ; Zinser *et al.*, 2003). Chez *E. coli* K12 cultivée en milieu riche LB, la phase de déclin intervient habituellement après 1 à 3 jours de culture (Finkel, 2006). Bien que les mécanismes moléculaires intervenant dans la transition phase stationnaire – phase de déclin soient peu connus, le pH et la densité cellulaire semblent être des paramètres cruciaux de la perte de viabilité cellulaire (Vulic et Kolter, 2002).

Après la phase de déclin, *E. coli* peut être maintenue en culture discontinue pendant une très longue période sans ajout de nutriments (Finkel et Kolter, 1999, Finkel, 2006) (Fig.1). La phase stationnaire prolongée est une période très dynamique au cours de laquelle les taux de division et de lyse cellulaire sont équilibrés. Les cellules peuvent subir des modifications génotypiques qui leur procurent un avantage de croissance en phase stationnaire (mutants GASP : Growth Advantage in Stationary Phase) (Finkel et Kolter, 1999 ; Zambrano *et al.*, 1993 ; Zinser et Kolter, 2004). Ces mutants apparaissent en général au bout de 8 à 10 jours de culture d'*E. coli* K12 en milieu riche et ont la particularité d'être plus

performants que des cellules plus jeunes (Zambrano et kolter, 1996 ; Zinser et Kolter, 2004). Cet avantage est déterminé génétiquement par des mutations apparaissant tout au long de la phase stationnaire prolongée. Certaines mutations ont été caractérisées et affectent des régulateurs globaux de la transcription comme RpoS, le facteur sigma spécifique de la phase stationnaire (Zambrano *et al.*, 1993), ou Lrp (Leucine Responsive protein), régulateur impliqué dans la réponse aux carences nutritionnelles (Landgraf *et al.*, 1996 ; Zinser et Kolter, 2000). Ces mutations GASP permettent notamment d'améliorer les capacités des cellules à métaboliser les acides aminés, disponibles en grande quantité après la lyse de la majorité de la population (Zinser et Kolter, 1999, 2000 et 2004 ; Zinser *et al.*, 2003).

Lorsque la population bactérienne est diluée dans du milieu frais, les cellules entrent à nouveau en phase de latence, puis le cycle recommence.

L'adaptation d'*E. coli* aux transitions nutritionnelles fait donc intervenir de nombreux changements phénotypiques, détaillés dans le prochain chapitre. Ces modifications sont étroitement contrôlées et régulées, notamment grâce à l'action de deux réseaux de régulation globale complexes et interconnectés : la réponse stringente (chapitre III) et la topologie de l'ADN (chapitre IV).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'enveloppe des bactéries Gram-**

L'enveloppe des bactéries Gram- est composée de 3 couches successives. Elle comporte une membrane externe qui contient des porines trimériques et des canaux de diffusion spécifique mono- ou trimériques. Cette membrane est liée à une couche fine de peptidoglycane via les lipoprotéines de Braun. La membrane externe et la couche de peptidoglycane entourent la membrane plasmique.



## **II. *Escherichia coli* et l'adaptation aux transitions nutritionnelles**

---

Les différentes modifications phénotypiques et métaboliques rencontrées par *E. coli* lors du passage de la phase de croissance exponentielle à la phase stationnaire sont résumées dans la figure 2.

### **II.1. L'enveloppe cellulaire et la membrane cytoplasmique face aux conditions environnementales**

#### **II.1.1. La membrane externe**

La membrane externe d'*E. coli* est formée d'une bicouche phospholipidique comportant des lipopolysaccharides (LPS) ainsi que des protéines, telles que les porines (Fig.3). Elle sert de barrière contre l'environnement extérieur et est le siège d'un certain nombre de modifications lors de transitions nutritionnelles.

##### II.1.1.1. Structure de la membrane externe

###### *i. Les lipopolysaccharides de la membrane externe*

Les LPS sont composés de trois parties : une partie proximale et hydrophobe appelée lipide A, une partie polysaccharidique distale et hydrophile en contact avec l'environnement (antigène O), et une région oligosaccharidique cœur qui connecte ces deux parties (Fig.3). Les souches de laboratoire type K12 et B ne comportent pas d'antigène O. La partie distale du cœur est également absente chez *E. coli* B (Nikaido, 1996). La partie la plus proximale du cœur est essentielle à l'assemblage de la membrane externe. Cette membrane comporte également d'autres polysaccharides présents en quantités plus faibles que les LPS.

###### *ii. Les protéines de la membrane externe*

###### a) La lipoprotéine de Braun

La lipoprotéine de Braun (Fig.3) est un petit polypeptide de 58 acides aminés portant à son extrémité N-terminale des constituants lipidiques. Avec  $7.10^5$  molécules par cellule, elle constitue la protéine la plus abondante d'*E. coli* (Nikaido, 1996). La partie lipidique est enchâssée dans la face interne de la membrane externe grâce à des liaisons

hydrophobes avec les phospholipides. La partie protéique est hydrophile et principalement située dans le périplasme. Certaines lipoprotéines de Braun sont associées de façon covalente avec le peptidoglycane, via leur partie protéique (Fig.3). Elles participent donc à la cohésion structurale des enveloppes en liant la membrane externe à la couche de peptidoglycane. Il existe plusieurs autres lipoprotéines qui participent également à la cohésion de l'enveloppe (Peptidoglycan-Associated proteins).

#### b) OmpA

La protéine OmpA est une protéine monomérique majeure de la membrane externe d'*E. coli* ( $10^5$  molécules par cellule). Le domaine N-terminal de OmpA est transmembranaire, il se replie sous forme de « tonneau » formé de huit feuillets  $\beta$  antiparallèles (Morona *et al.*, 1984 ; Vogel et Jahnig, 1986). Le domaine C-terminal est périplasmique. La protéine OmpA joue un rôle de récepteur lors de la conjugaison et elle est importante pour le maintien de l'intégrité de la membrane externe (Nikaido et Vaara, 1985 ; Nikaido, 1996). Elle forme également des canaux de diffusion non spécifiques (Sugawara et Nikaido, 1992).

#### c) Les porines majeures : OmpC, OmpF, PhoE

Les porines sont des protéines abondantes qui traversent de part en part la membrane externe. Organisées en trimères, elles délimitent trois pores qui livrent passage de façon non spécifique à de petites molécules hydrophiles jusqu'à 600da (Fig.3). Chez *E.coli* K12, trois porines majeures ont été décrites : OmpC, OmpF et PhoE. La concentration des porines OmpC et OmpF est régulée en fonction des conditions du milieu, notamment lors d'un stress osmotique (Nikaido et Vaara, 1985 ; Graeme-Cook *et al.*, 1989). Contrairement à OmpC et OmpF, la porine PhoE est spécifique des conditions de carence en phosphate (Nikaido et Vaara, 1985).

#### d) Les canaux spécifiques et les récepteurs de la membrane externe

La membrane externe présente un certain nombre de protéines permettant le passage de molécules spécifiques. La protéine trimérique LamB (récepteur du phage  $\lambda$ ), permet par exemple le passage spécifique du maltose et des maltodextrines. Dans certaines conditions, elle peut cependant également permettre la diffusion non spécifique de molécules plus petites comme le glucose.

Les récepteurs de la membrane externe lient leurs ligands avec une très haute affinité et requièrent la présence de la protéine de la membrane plasmique TonB pour permettre le passage du ligand à travers la membrane externe (Postle, 1993). Ces protéines permettent le transport de molécules dont la taille est trop importante pour passer au travers des porines, et/ou dont la concentration est faible. La membrane externe présente également

des récepteurs spécifiques pour les complexes fer-sidérophore, procurant à la cellule le fer indispensable à sa croissance (McIntosh et Earhart, 1976, 1977 ; Klebba *et al.*, 1982).

#### II.1.1.2. Structure de la membrane externe en fonction des conditions de croissance

Lors de changements de conditions environnementales, la structure et la composition lipidique et protéique de la membrane externe d'*E. coli* subissent de nombreux changements permettant l'adaptation des bactéries.

##### *i. Modifications de composition membranaire*

Lors de l'entrée en phase stationnaire, la composition de la membrane externe varie (Fig.2). La quantité de lipopolysaccharides exposés sur la surface externe augmente (Nikaido, 1996). Ceci entraîne une augmentation de la charge globale à la surface de la cellule, permettant probablement d'accroître la résistance de la membrane à des agents néfastes. D'autre part, bien que le taux de protéines associées à la membrane externe diminue (Allen et Scott, 1979), la synthèse de certaines d'entre elles est induite lors du passage en phase stationnaire. C'est notamment le cas des protéines constituant les curlis, qui permettent l'attachement des cellules à la surface d'un milieu solide, et la formation de biofilms (Olsen *et al.*, 1989 ; Vidal *et al.*, 1998 ; Prigent-Combaret *et al.*, 2001). La synthèse de flagelline est également induite en début de phase stationnaire, puis rapidement réprimée (Amsler *et al.*, 1993). L'accroissement temporaire de la motilité grâce aux flagelles peut permettre aux cellules d'atteindre des sources de carbone alternatives et/ou de s'éloigner d'un environnement néfaste. Dans le cas des bactéries pathogènes, cela permet aux cellules de passer au stade de transmission de façon à infecter de nouvelles cellules hôtes. Du côté périplasmique de la membrane externe, la quantité de lipoprotéines liées au peptidoglycane augmente (Wensink *et al.*, 1982), ce qui permet de stabiliser la structure de l'enveloppe lorsque les conditions se détériorent.

##### *ii. Modifications de perméabilité membranaire*

Lors de carences nutritionnelles, la perméabilité de la membrane externe est modifiée via un changement de concentration des porines. Ceci permet de protéger la cellule contre certains stress et de favoriser l'entrée des molécules améliorant sa croissance.

L'expression de la porine PhoE est par exemple induite lors de carences en phosphate, permettant ainsi la diffusion rapide de composés phosphorylés (Nikaido et Vaara, 1985). La biosynthèse du récepteur LamB est induite en présence de maltose ou dans des

conditions de carences en source de carbone, ce qui permet l'import de sucres de petite taille tels que le glucose ou le glycérol (Death *et al.*, 1993). Les protéines permettant le transport des complexes sidérophore-fer sont exprimées lorsque le milieu est carencé en fer, permettant de pallier à cette déficience (Klebba *et al.*, 1982). Enfin, la synthèse des porines OmpC et OmpF est dépendante de la quantité de nutriments disponibles. En effet, la perméabilité membranaire dans des conditions limitées en azote, serait plutôt basée sur OmpC, tandis que le niveau de OmpF augmenterait préférentiellement suite à des carences en sources de carbone (Liu et Ferenci, 1998). La concentration de ces deux porines, qui diffèrent par la taille de leurs pores, est également régulée lors de stress. La porine OmpC présente des pores plus petits que OmpF (Nikaido et Rosenberg, 1983) et son expression est favorisée lors de stress, limitant ainsi la perméabilité de la membrane. La régulation de l'expression de ces deux porines est complexe et fait intervenir entre autres le système à deux composantes EnvZ-OmpR (Graeme-Cook *et al.*, 1989 ; Mizuno et Mizushima, 1990 ; Stock *et al.*, 1989). Dans des conditions de forte pression osmotique, l'activité de phosphorylation de la protéine EnvZ augmente, ce qui conduit à l'augmentation de la concentration de la forme phosphorylée active du facteur de transcription OmpR. Cela conduit à l'activation de la transcription de *ompC*, et l'inhibition de celle de *ompF*. La proportion de OmpC augmente alors par rapport à OmpF, diminuant ainsi la perméabilité de la membrane. Alors que la perméabilité membranaire vis-à-vis de grosses molécules est réduite de façon drastique, l'entrée des petits nutriments comme le glucose diminue seulement de 50% en cas de forte osmolarité. Un deuxième système à deux composantes régule également la production de OmpF et OmpC. Il s'agit du système CpxA-CpxR, impliqué dans la réponse aux stress de l'enveloppe, comme le stress alcalin ou la surproduction de protéines sécrétées (Danese *et al.*, 1995 ; Danese et Silhavy, 1998 ; Cosma *et al.*, 1995 ; Raivio et Silhavy, 1997 ; Batchelor *et al.*, 2005). Enfin, d'autres régulateurs, tels que le facteur sigma de la phase stationnaire RpoS, les protéines du nucléoïde H-NS et IHF, et le facteur de transcription Lrp (Liu *et al.*, 2000 ; Liu et Ferenci, 2001 ; Tsui *et al.*, 1988 ; Ferrario *et al.*, 1995) sont impliqués dans cette régulation différentielle de la transcription de *ompC* et *ompF* en fonction des conditions de croissance. L'expression de OmpC et OmpF est également régulée au niveau post-transcriptionnel, grâce à des ARN antisens codés par *micC* et *micF*, qui peuvent s'hybrider aux ARNm de *ompC* et *ompF* respectivement et inhibent ainsi leur traduction dans certaines conditions (Chen *et al.*, 2004 ; Mizuno, 1984 ; Nikaido, 1996).



### II.1.2. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est l'élément structural de base de l'enveloppe bactérienne. Il permet le maintien de la forme cellulaire et protège la bactérie notamment contre les variations de pression osmotique. Chez les bactéries Gram-négatives et en particulier *E. coli*, il forme une couche d'environ 3 à 7 nm d'épaisseur associée à la membrane externe via les lipoprotéines de Braun (Fig.3). Il subit également des modifications selon les conditions de croissance.

#### II.1.2.1. Structure du peptidoglycane

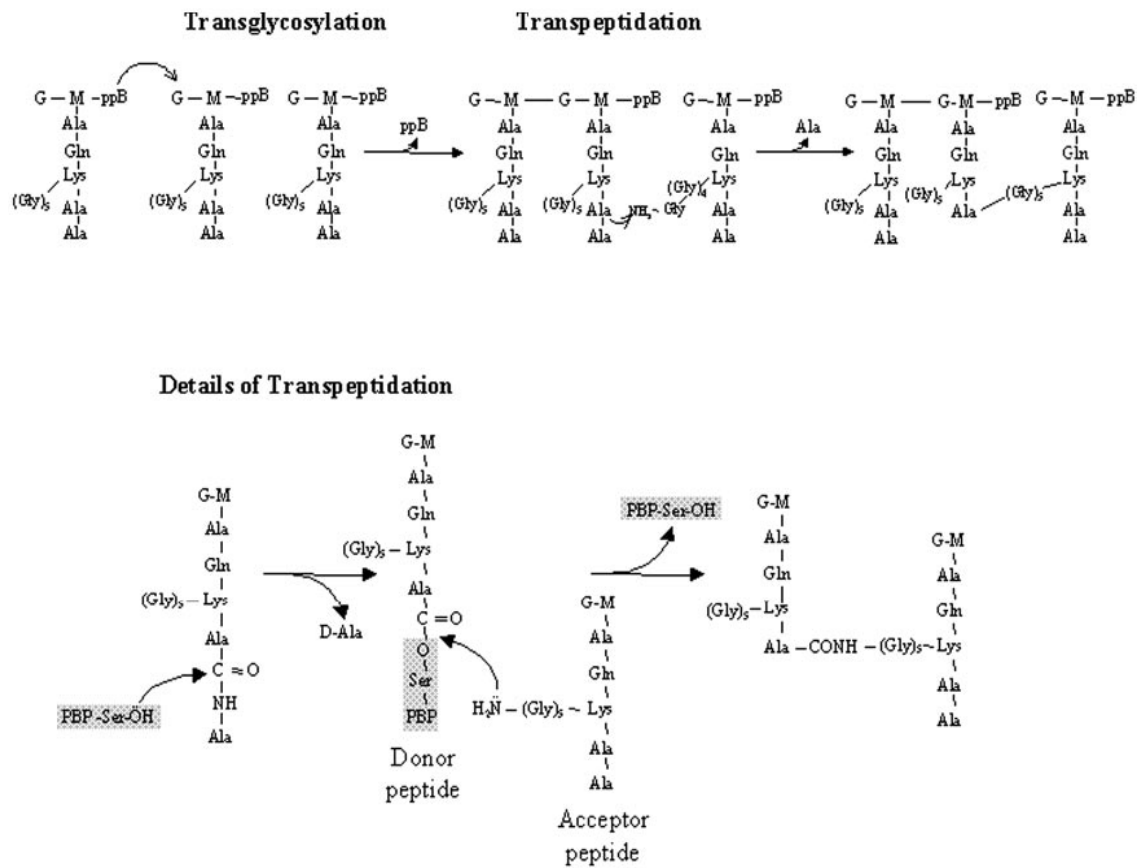
Le peptidoglycane est un réseau macromoléculaire composé de chaînes de glycane assemblées via des chaînons peptidiques (Fig.4). Les chaînes de glycane sont formées de répétitions d'unités disaccharidiques (Fig.4). Chaque unité est composée de *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNac ou NAG) reliée à un acide *N*-acétyl-D-muramique (MurNac ou NAM) via une liaison glycosidique  $\beta(1-4)$ . Un pentapeptide vient s'ancrer sur le groupement carboxyle de l'acide *N*-acétyl-D-muramique par l'intermédiaire d'une liaison amide. Ce pentapeptide est formé d'acides aminés de formes L et D. Le premier acide aminé lié à l'acide *N*-acétyl-D-muramique est toujours la L-alanine, suivie du D-isoglutamate, de l'acide *méso*-diaminopimélique et de deux D-alanines. Les parties peptidiques appartenant à des chaînes de glycane adjacentes sont reliées entre elles par des ponts interpeptidiques qui s'établissent entre l'avant dernier acide aminé D-alanine (n°4) et l'acide aminé dibasique n°3 (acide *méso*-diaminopimélique) de la chaîne voisine (Fig.4). Chez *E. coli*, la liaison est directe.

#### II.1.2.2. Biosynthèse du peptidoglycane

La synthèse du peptidoglycane peut être séparée en deux étapes. Les monomères disaccharide-pentapeptide sont d'abord synthétisés dans le cytoplasme, puis transportés dans le périplasme. C'est dans ce compartiment que se produisent la polymérisation et la réticulation des chaînes de glycane.

##### *i. Biosynthèse du précurseur du peptidoglycane : le disaccharide-pentapeptide*

Les enzymes de la famille Mur (MurA à MurF) catalysent la formation d'UDP-MurNac à partir d'UDP-GlcNac, puis l'ajout successif des cinq acides aminés de la partie peptidique. L'UDP-MurNac-pentapeptide est ensuite transféré par MraY sur un intermédiaire



**Figure 5 : Polymérisation et réticulation des chaînes de glycane grâce aux PBPs (d'après Scheffers et Pinho, 2005).** La réaction de transglycosylation permet de lier les unités disaccharide-pentapeptide et d'allonger les chaînes de glycane. La réaction de transpeptidation permet de réticuler les chaînes de glycane par liaison des pentapeptides de chaînes adjacentes. Cette réaction s'effectue entre l'acide aminé n°4 d'un peptide donneur et l'acide aminé dibasique n°3 d'un peptide accepteur. Elle aboutit au clivage du dernier acide aminé D-alanine du peptide donneur. Les PBPs de classe A catalysent les réactions de transglycosylation et de transpeptidation, tandis que les PBPs de classe B ne catalysent que la réaction de transpeptidation.

membranaire, l'undécaprényl-phosphate pour donner le MurNac-pentapeptide-phosphoryl-undecaprenol, appelé lipide I. La protéine MurG additionne un UDP-GlcNac au résidu MurNac du lipide I, formant ainsi le lipide II, le précurseur du peptidoglycane, ensuite transféré dans le périplasme où les étapes finales de synthèse du peptidoglycane sont catalysées (Höltje, 1998 ; Van Heijenoort, 2001).

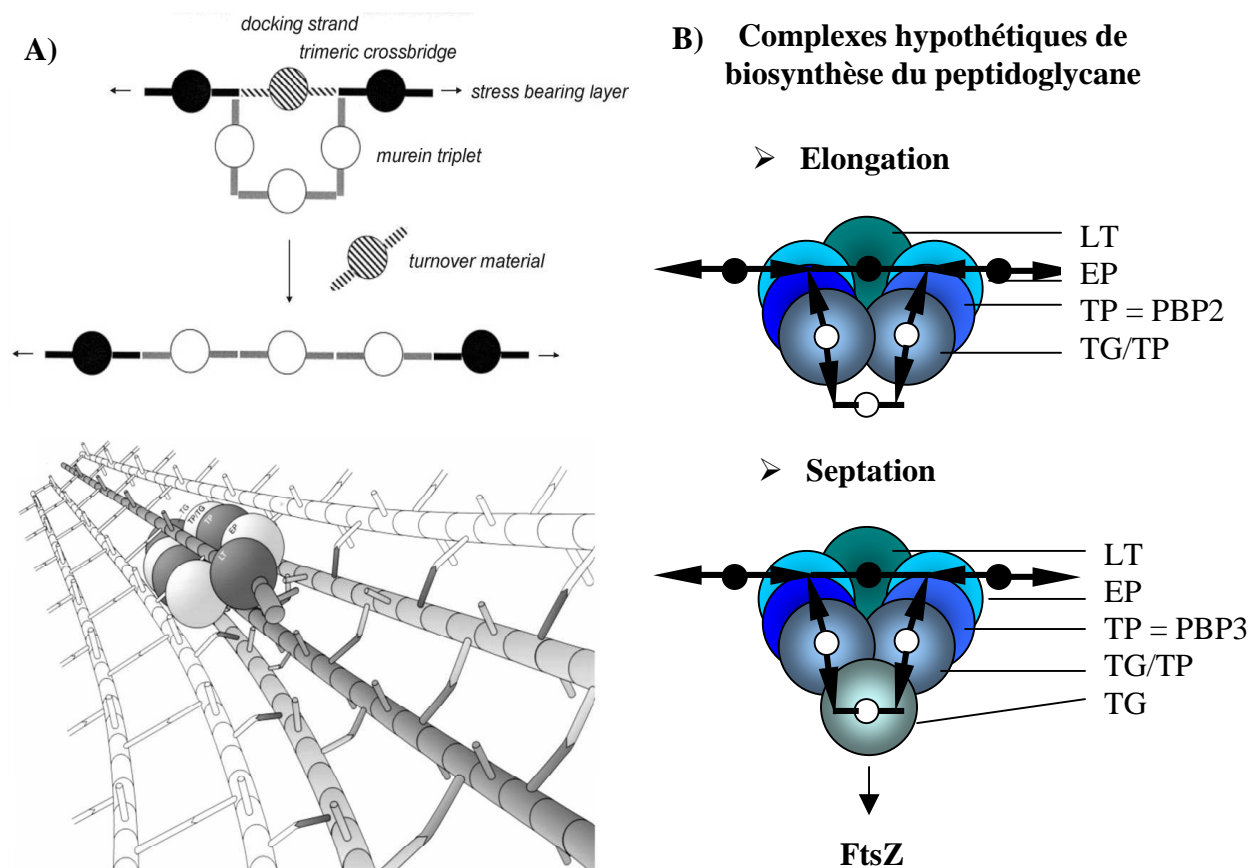
*ii. Polymérisation et réticulation du peptidoglycane : les PBPs et les hydrolases*

Ce sont les protéines liant la pénicilline (Penicillin-Binding-Proteins, PBPs) de haut poids moléculaire qui catalysent la polymérisation et la réticulation des chaînes de glycane respectivement grâce à des activités glycosyltransférase et transpeptidase (Fig.5). Elles peuvent être séparées en deux classes : les PBPs de classe A, telles que PBP1a et PBP1b, possèdent à la fois les activités transpeptidase et transglycosylase, tandis que les PBPs de classe B, comme PBP2 et PBP3, ne possèdent que l'activité transpeptidase (Ghuysen, 1991 ; Goffin et Ghuysen, 1998). Ces deux activités sont portées par les domaines extracellulaires des PBPs qui sont ancrées dans la membrane cytoplasmique via leur partie N-terminale.

La réaction glycosyltransférase catalyse le transfert d'un monomère disaccharide-pentapeptide à l'extrémité d'une chaîne de glycane pré-existante (Fig.5). L'undécaprényl-pyrophosphate est alors libéré et recyclé. Chez *E. coli*, les chaînes de glycane comportent en moyenne 5 à 10 unités disaccharidiques (Harz *et al.*, 1990). La chaîne de glycane est ensuite reliée aux chaînes adjacentes grâce à l'activité transpeptidase des PBPs (Fig.5). Elles catalysent la formation de ponts peptidiques entre l'acide aminé n°4 (D-alanine) d'un peptide donneur et le groupe  $\epsilon$ -aminé porté par l'acide aminé dibasique n°3 (acide diaminopimélique) d'un peptide accepteur. Le résidu D-alanine terminal du peptide donneur est clivé et libéré lors de cette réaction (Fig.5). L'activité transpeptidase est inhibée par des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines qui, par analogie structurale avec le résidu D-alanyl-D-alanine terminal du pentapeptide, se lient de façon covalente au site catalytique du domaine transpeptidase des PBPs (Moore *et al.*, 1979 ; Granier *et al.*, 1994).

Les PBPs de faible poids moléculaire sont des DD-peptidases monofonctionnelles. La plupart sont des DD-carboxypeptidases, mais certaines possèdent des activités transpeptidase ou endopeptidase. Les PBPs DD-carboxypeptidases permettent le clivage du résidu D-alanine terminal, empêchant ainsi la réaction de transpeptidation par les PBPs de haut poids moléculaire. Cette réaction permet de contrôler le degré de réticulation et la flexibilité du peptidoglycane. Elle est également inhibée par les  $\beta$ -lactamines.





**Figure 6 : Modèle « 3 pour 1 » de synthèse de peptidoglycane (d'après Höltje, 1998).** A) Selon ce modèle, trois brins de peptidoglycane néosynthétisés sont insérés dans la couche de peptidoglycane grâce à l'intervention d'un complexe multienzymatique. Ce complexe synthétise les trois nouveaux brins et les lie par des ponts interpeptidiques aux brins situés de part et d'autre du brin matrice central (docking strand) grâce à des activités transglycosylases (TG) et transpeptidases (TP). Le brin central est alors dégradé par l'action d'une transglycosylase lytique (LT) et d'un dimère d'endopeptidase (EP). B) Complexes hypothétiques de biosynthèse du peptidoglycane. Deux complexes de synthèse de peptidoglycane similaires pourraient exister, leur spécificité étant assurée par la présence de PBP2, spécifique de l'élongation, ou PBP3, spécifique de la septation. La protéine FtsZ est impliquée dans la formation du septum. Les cercles noirs représentent les brins de glycane préexistants, tandis que les cercles blancs représentent les brins néosynthétisés. Les flèches et traits noirs représentent les peptides accepteurs et donneurs des ponts interpeptidiques.

Afin de permettre l'élongation de la couche de peptidoglycane lors de la croissance et de la division cellulaire, il est nécessaire de permettre aux extrémités acceptrices d'incorporer de nouvelles unités de peptidoglycane. Ceci nécessite une digestion limitée du peptidoglycane qui se produit grâce à des hydrolases, certaines pouvant cliver les chaînes polysaccharidiques, d'autres les chaînes peptidiques (Karamanos, 1997 ; Votsch et Templin, 2000 ; Yem et Wu, 1976 ; Höltje, 1995). Les hydrolases du peptidoglycane sont également essentielles dans des processus tels que l'autolyse, le recyclage du peptidoglycane, la séparation des cellules filles, la virulence....(Margot *et al.*, 1998 ; Votsch et templin, 2000 ; Templin *et al.*, 1999 ; Heidrich *et al.*, 2002 ; Höltje, 1995 ; Boneca, 2005 ; Sun *et al.*, 2000).

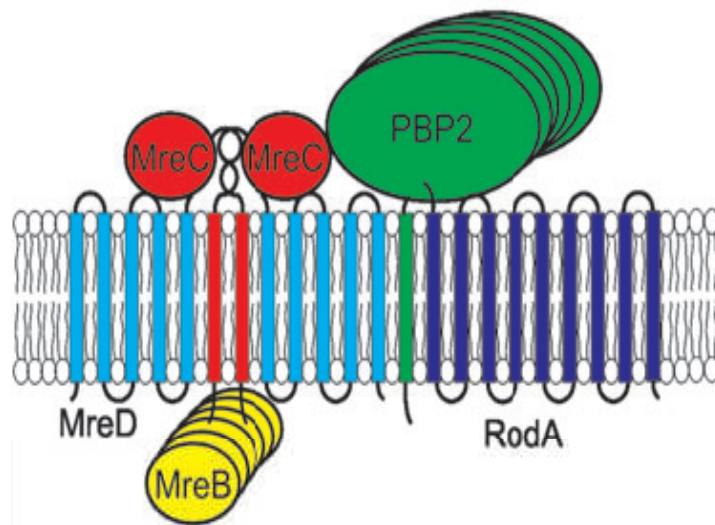
### II.1.2.3. Métabolisme du peptidoglycane en fonction des conditions de croissance

#### *i. La phase de croissance exponentielle*

Pendant la phase de croissance exponentielle, les cellules d'*E. coli* se présentent sous forme de bacille, et leur vitesse de division est maximale (Fig.2). A chaque cycle de division, la paroi bactérienne s'allonge jusqu'à atteindre deux fois sa longueur, sans changer de diamètre, puis la formation du septum commence et la bactérie se divise pour former deux cellules-filles (Fig.2). La biosynthèse du peptidoglycane lors des processus d'élongation et de septation fait intervenir des enzymes différentes.

#### a) L'élongation de la cellule

L'élongation du peptidoglycane fait intervenir à la fois des synthétases (PBPs) et des hydrolases qui clivent le peptidoglycane et permettent l'incorporation de nouvelles unités de disaccharide-pentapeptide dans le réseau pré-existant. Ce système permet également l'élimination et le recyclage du matériel plus ancien. Höltje a proposé un modèle de synthèse appelé « modèle 3 pour 1 », dans lequel 3 brins préexistants servent de matrice (Fig.6A). Trois chaînes de glycane néosynthétisées et pontées entre elles sont liées par transpeptidation aux brins situés de part et d'autre du brin central de la matrice (Höltje, 1998). Les ponts peptidiques entre le brin central et les brins latéraux de la matrice sont ensuite clivés et le brin central est libéré pour être recyclé, tandis que les trois brins sont insérés dans le réseau de peptidoglycane (Fig.6A). Cette stratégie requiert une action coordonnée de différentes enzymes, c'est pourquoi l'existence de complexes multienzymatiques a été suggérée (Höltje, 1998, 1996) (Fig.6B). Cette hypothèse est supportée par des expériences de chromatographie d'affinité, de pontages protéiques et de co-immunoprécipitation qui révèlent des interactions entre des PBPs, des hydrolases et des protéines de structure (Romeis et Höltje, 1994 ; Vollmer



**Figure 7 : Schéma représentant l'hypothèse selon laquelle le complexe MreBCD interagirait avec les protéines impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane lors de l'élongation (PBP2, RodA) (d'après Kruse *et al.*, 2005).**

*et al.*, 1999 ; Von Rechenberg *et al.*, 1996 ; Figge *et al.*, 2004). L'incorporation d'unités disaccharide-pentapeptide dans le peptidoglycane lors de l'élongation s'effectue de façon diffuse autour de la cellule.

L'élongation du peptidoglycane ainsi que le maintien du diamètre et de la forme cylindrique des cellules font intervenir spécifiquement la protéine PBP2 qui possède une activité transpeptidase. La protéine PBP2 est codée par le gène *pbpA* formant un opéron avec *rodA*, qui code une protéine également impliquée dans la forme des cellules (Spratt *et al.*, 1980). Il semblerait que la protéine PBP2 nécessite la protéine RodA pour être fonctionnelle. En effet, des mutants *rodA* présentent des phénotypes similaires aux mutants *pbpA* (Ishino *et al.*, 1986 ; Matsuzawa *et al.*, 1973 ; Tamaki *et al.*, 1980). Cependant, l'activité enzymatique de RodA n'est pas identifiée. La protéine PBP2 est localisée de façon diffuse autour de la cellule et au niveau des sites de division (Den Blaauwen *et al.*, 2003). Elle disparaît cependant du septum avant la séparation des cellules-filles et ne semble pas intervenir dans la division cellulaire (Den Blaauwen *et al.*, 2003). L'inhibition spécifique de PBP2 par addition de méicillinaam modifie la morphologie cellulaire et produit des cellules sphériques qui finissent par lyser (Ogura *et al.*, 1989 ; Botta et Buffa, 1981 ; Canepari *et al.*, 1993 ; Signoretto *et al.*, 1996 ; Spratt, 1977 ; Iwaya *et al.*, 1978 ; Rodriguez et De Pedro, 1990). La protéine PBP2 est donc essentielle au maintien de la forme des bactéries et à la survie cellulaire sauf lors d'une surexpression de la protéine FtsZ, impliquée dans la formation des septas, ou de (p)ppGpp, alarmone impliquée dans la réponse aux carences nutritionnelles et qui active le gène *ftsZ* (Vinella *et al.*, 1992, 1993 ; Joseleau-Petit *et al.*, 1994 ; Powell et Court, 1998). Le volume des cellules sphériques résultant d'une inactivation de PBP2 étant accru, la concentration relative de FtsZ serait plus faible et sa surexpression permettrait de compenser la perte de PBP2 (Vinella *et al.*, 1993).

Le maintien de la forme cellulaire fait également intervenir les protéines essentielles MreC, MreD et MreB (Jones *et al.*, 2001 ; Scheffers et Pinho, 2005 ; Kruse *et al.*, 2005). Une mutation affectant la synthèse d'une de ces protéines produit une morphologie sphérique avec un diamètre accru (Kruse *et al.*, 2005). D'autre part, ces protéines sont nécessaires à l'insertion des précurseurs du peptidoglycane dans la paroi (Daniel et Errington, 2003). Chez *E. coli*, une étude par double hybride bactérien montre que les trois protéines interagissent, ce qui suggère qu'un complexe protéique impliquant ces trois partenaires contrôlerait la largeur de la cellule via la synthèse du peptidoglycane (Kruse *et al.*, 2005) (Fig.7). Les protéines MreC et MreD sont disposées dans la membrane plasmique selon un profil hélical chez *Bacillus subtilis* (Leaver et Errington, 2005). Il a été proposé que cette

structure en hélice forme un échaffaudage pour les protéines impliquées dans la biosynthèse de la paroi (Daniel et Errington, 2003 ; Figge *et al.*, 2004 ; Jones *et al.*, 2001 ; Kruse *et al.*, 2005). Ce modèle n'est pas encore validé bien que quelques résultats semblent le confirmer. Par exemple, chez *Caulobacter crescentus*, le profil de distribution de PBP2 correspond à celui de MreB, cette distribution étant altérée en cas de mutation *mreB* (Figge *et al.*, 2004) (Fig.7).

#### b) La septation

La septation est un processus complexe qui implique des contrôles topologiques et temporels. Deux nouvelles couches polaires de peptidoglycane doivent être synthétisées au centre de la cellule, et les deux cellules-filles doivent être séparées grâce à des hydrolases du peptidoglycane, sans rompre l'intégrité de leur enveloppe. L'intervention d'une quinzaine de gènes est requise de l'initiation de la septation à la séparation des cellules-filles. Les gènes intervenant dans la formation du divisome sont tous situés dans un large cluster de gènes de 2 minutes, appelé cluster *mra* (Tamaki *et al.*, 1980 ; Lutkenhaus et Addinall, 1997). Les sept gènes les plus clairement impliqués dans la septation sont *ftsI*, *ftsQ*, *ftsA*, *ftsZ*, *ftsW*, *ftsN*, *ftsL* (*fts* : filamenting temperature sensitive).

Pendant le cycle cellulaire, la protéine de type tubuline FtsZ, possédant une activité GTPase, s'accumule sous la membrane plasmique au niveau du septum et polymérise pour former un anneau (Bi et Lutkenhaus, 1991). Pendant l'invagination du septum, l'anneau de FtsZ se « resserre » en restant sur le bord du septum (Addinall *et al.*, 1996). Les protéines FtsA, ZipA, FtsQ, FtsL, PBP3, FtsN, FtsK et FtsW viennent ensuite s'assembler au septum (Ma *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1997 ; Ghigo *et al.*, 1999). Deux PBPs sont impliquées dans ce processus. D'une part, la protéine PBP7 est une D,D-endopeptidase clivant les pontages dans le réseau de peptidoglycane. D'autre part, la protéine PBP3, codée par *ftsI*, possède une activité transpeptidase et est responsable de la biosynthèse du peptidoglycane au niveau des septa (Spratt, 1977 ; Pogliano *et al.*, 1997) (Fig.6B). Elle interagit avec les protéines FtsA, FtsL, FtsN, FtsQ, et FtsW ce qui la stabilise au niveau du site de division (Karimova *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 1998 ; Weiss *et al.*, 1999). C'est une protéine indispensable à la division cellulaire. Chez des mutants *ftsI*, le chromosome continue de se répliquer et l'enveloppe s'allonge normalement, mais les cellules ne se divisent plus, ce qui résulte en un phénotype filamenteux (Spratt, 1977).

#### ii. *Le passage en phase stationnaire*

Lors de l'entrée en phase stationnaire, la taille des cellules diminue (Fig.2). Ceci est essentiellement dû à deux phénomènes. D'une part, les cycles de répllication du

chromosome et de division cellulaire s'achèvent alors que les cellules ont déjà fini de s'allonger, ce phénomène étant appelé « division réductive » (Nyström, 2004). Le rapport surface / volume augmente. Ceci permet d'accroître les échanges avec l'environnement et peut donc se révéler bénéfique pour les bactéries (Nyström, 2004). D'autre part, les cellules produites pendant cette phase sont coccoïdes, ce qui implique des modifications du métabolisme et de la structure du peptidoglycane au cours desquelles les PBPs jouent un rôle important (Blasco *et al.*, 1988) (Fig.2). Ces changements font intervenir de nombreux régulateurs globaux, comme (p)ppGpp, CRP, RpoS (Dougherty et Pucci ; 1994, Lange et Hengge-Aronis, 1991a ; Rodionov et Ishiguro, 1995 ; Aldea *et al.*, 1989 ; Bohannon *et al.*, 1991 ; D'Ari *et al.*, 1988) et sont de 4 types :

- i) diminution de la longueur des chaînes de glycane.
- ii) Augmentation de l'épaisseur du peptidoglycane (Leduc *et al.*, 1989 ; Mengin-Lecreux et Van Heijenoort, 1985), ainsi que des pontages et des points d'attachement à la membrane externe, ce qui permet une stabilisation de l'enveloppe cellulaire (Pisabarro *et al.*, 1985 ; Wensink *et al.*, 1982).
- iii) Ralentissement de la synthèse et de la translocation des précurseurs du peptidoglycane à travers la membrane plasmique (Mengin-Lecreux et Van Heijenoort, 1985 ; Fujisaki *et al.*, 1986).
- iv) Modification de l'activité de quelques enzymes de biosynthèse du peptidoglycane et de certaines PBPs (Mengin-Lecreux et Van Heijenoort, 1985 ; Van der Linden *et al.*, 1992).

Au cours des transitions croissance – carence et carence - croissance, l'expression des PBPs est modifiée de façon importante. La synthèse de PBP2 et PBP3 diminue en phase stationnaire (Liao et Hancock, 1997), notamment sous l'influence de RpoS, le facteur sigma spécifique de la phase stationnaire (Dougherty et Pucci, 1994). D'autre part, RpoS active l'expression du morphogène *bolA* (Lange et Hengge-Aronis, 1991a ; Santos *et al.*, 2002), qui code un régulateur affectant la morphologie cellulaire. La protéine BolA contrôle en effet la transcription de *dacA*, codant la PBP5, *ampC*, qui code une  $\beta$ -lactamase (Santos *et al.*, 2002) et *dacC*, codant la PBP6, supposée stabiliser le peptidoglycane pendant la phase stationnaire (Van der Linden *et al.*, 1992 ; Buchanan et Sowell, 1982).

Après la division réductive, la taille des cellules continue de diminuer. Ceci est le résultat de la dégradation du matériel endogène, notamment la membrane plasmique et la couche de peptidoglycane. Ce phénomène est donc une sorte d'autophagie (Nyström, 2004). Il fournit aux cellules des sources de carbone et d'énergie en dégradant les acides gras. Il est en partie sous contrôle du régulon FadR, réprimé en phase exponentielle et déréprimé par

(p)ppGpp lors de l'entrée en phase stationnaire (Kvint *et al.*, 2000). Ce phénomène fait également intervenir des peptidases qui permettent de libérer des acides aminés pour la synthèse protéique *de novo* (Reeve *et al.*, 1984).

### **II.1.3. La membrane cytoplasmique**

La membrane cytoplasmique constitue la barrière la plus importante entre le cytoplasme et l'environnement chez les bactéries Gram-. Elle protège la cellule contre les stress chimiques et physiques. Elle régule les échanges avec l'environnement, c'est-à-dire l'entrée de nutriments et la sortie de métabolites. Elle joue également un rôle crucial au niveau métabolique puisqu'elle est le siège de la synthèse d'énergie. En effet, la chaîne de transport d'électrons est située au niveau de cette membrane. Comme dans le cas de l'enveloppe, sa composition dépend fortement des conditions de croissance (Fig.2).

#### **II.1.3.1. Composition**

La membrane cytoplasmique est une bicouche phospholipidique qui contient de façon prédominante des phospholipides et des protéines, ainsi que quelques glycolipides et lipopolysaccharides. Elle comporte trois espèces majeures de phospholipides : 70 à 80 % de phosphatidyléthanolamine (PE), 15 à 25 % de phosphatidylglycérol (PG), et 5 à 10 % de diphosphatidylglycérol (DPG) encore appelé cardiolipine (Vanden Boom et Cronan, 1989). Tous les phospholipides contiennent du *sn*-glycérol-3-phosphate estérifié avec des acides gras saturés et insaturés.

De nombreuses protéines intrinsèques ou extrinsèques sont associées à la membrane cytoplasmique. Elles permettent entre autre l'export de polypeptides, ou le transport de molécules spécifiques (perméases). Des ATPases, permettant la translocation d'ions et de protons, ainsi que les PBP sont ancrées dans cette membrane. C'est également le cas de l'ATP synthase qui joue un rôle central dans la bioénergétique des bactéries en utilisant le gradient de protons généré par la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP. La membrane plasmique remplit des fonctions métaboliques vitales comme la respiration et les échanges avec l'extérieur. Les composants de la chaîne respiratoire, c'est-à-dire les déshydrogénases, et les coenzymes qui leur sont associés (cytochromes, cytochromes-oxydases, ubiquinones, ménaquinones), sont associés à cette membrane.

Les bactéries peuvent utiliser une grande variété de sources de carbone, dont la translocation à travers la membrane plasmique est assurée par des systèmes de transport spécifiques. Les systèmes PTS (systèmes phosphotransférase) assurent par exemple le transport du glucose, du saccharose, du fructose... D'autres carbohydrates, comme le maltose ou le lactose, pénètrent dans la cellule via des systèmes spécifiques de transport actif non-PTS (Postma et Lengeler, 1996). Cependant, en fonction des conditions, une source de carbone peut être transportée par différents mécanismes (Death *et al.* 1993 ; Death et Ferenci, 1994).

#### II.1.3.2. Remaniements de la membrane cytoplasmique en fonction des conditions de croissance

Comme la couche de peptidoglycane et la membrane externe, la membrane cytoplasmique subit des remaniements importants en fonction des conditions environnementales. Les trois types de constituants membranaires (phospholipides, transporteurs d'électrons, protéines de transport) fluctuent en fonction des conditions de l'environnement. Quelques exemples, non exhaustifs, sont donnés ci-dessous.

Lors de carences, la synthèse des phospholipides est inhibée par (p)ppGpp qui réprime l'expression de la glycérol-3-phosphate acyltransférase codée par *plsB* (Heath *et al.*, 1994). La composition des phospholipides de la membrane plasmique change de façon drastique en réponse aux carences (Fig.2). La teneur en acide palmitoléique et acide oléique, les deux acides gras monoinsaturés prédominants, diminue à l'entrée en phase stationnaire, tandis que la quantité de dérivés d'acides gras cyclopropyl augmente (El Khani et Stretton, 1981 ; Taylor et Cronan, 1976). Le groupement de tête des phospholipides est également modifié : le niveau de phosphatidylglycérol diminue tandis que la quantité de cardiolipine augmente (Ahlers et Gunther, 1975 ; McGarrity et Armstrong, 1975) (Fig.2). Les phospholipides sont également modifiés de façon à permettre le maintien de la fluidité membranaire en fonction des conditions (Sullivan *et al.*, 1979).

Les propriétés des systèmes de transport d'électrons varient en fonction des conditions de croissance. La composition de la chaîne de transport d'électrons varie en fonction de la disponibilité en oxygène. Par exemple, la succinate déshydrogénase est induite en condition aérobie en présence de sources de carbone non fermentables (Ingledew et Poole, 1984). L'ubiquinone est remplacée par la ménaquinone en anaérobiose (Kadner, 1996). Des réductases utilisant le nitrate, le nitrite ou le fumarate comme accepteurs terminaux



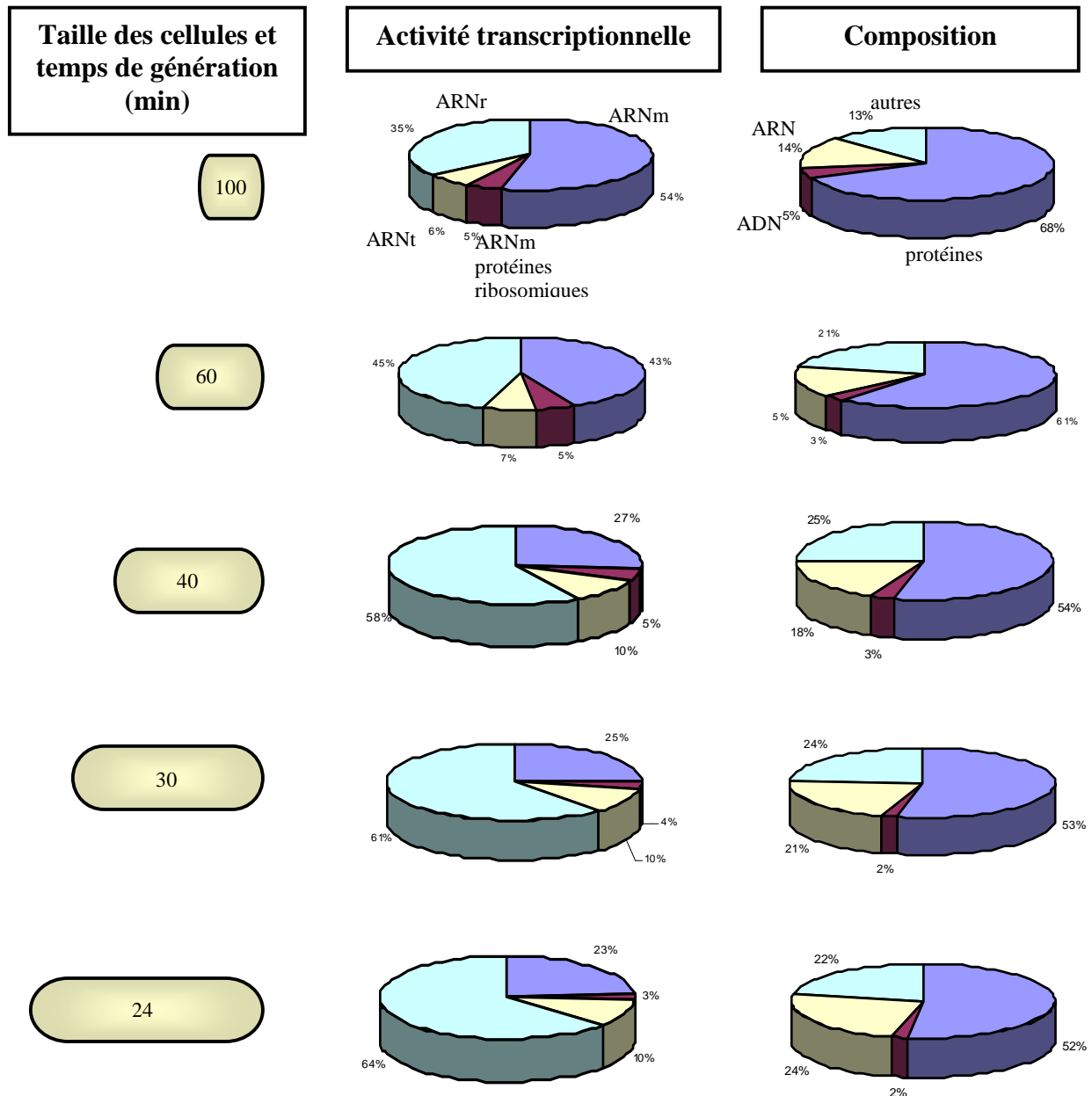
d'électrons sont exprimées seulement en anaérobiose grâce à l'activateur Fnr (Iuchi *et al.*, 1986 ; Spiro et Guest, 1990).

Les autres systèmes transporteurs situés dans la membrane plasmique s'adaptent également aux conditions de l'environnement, notamment aux conditions de pH et d'osmolarité. Un milieu à forte osmolarité augmente le transport du potassium via la membrane plasmique ce qui active la synthèse de systèmes de transport d'osmoprotecteurs comme le tréhalose ou la proline (Csonka, 1989 ; Csonka et Hanson, 1991). Les antiporteurs sodium/protons NhaA et NhaB participent à l'acidification du cytoplasme lorsque l'environnement est alcalin (Kadner, 1996).

La production des transporteurs de sources de carbone dépend de la composition du milieu. Par exemple, le transporteur de proline PutP permet à la cellule d'utiliser la proline comme seule source de carbone ou d'azote lorsqu'il est exprimé avec PutA. Lorsque la proline est présente en grande concentration, PutA se lie à la membrane et permet le transfert des électrons de la proline à la chaîne de transfert d'électrons. Si la proline est à un niveau faible, PutA se lie à l'ADN et réprime la transcription de *putP* et *putA* (Ostrovsky *et al.*, 1991 ; Brown et Wood, 1993). Les systèmes de transport de sucres PTS jouent un rôle clé dans la répression catabolique qui coordonne le métabolisme des hydrates de carbone. Le glucose est le substrat privilégié d'*E. coli* et sa présence bloque le transport et le catabolisme des autres sucres. Cette régulation fait intervenir le régulateur transcriptionnel CRP (cAMP receptor protein). Lorsque la quantité de glucose diminue, la concentration de la forme phosphorylée de la protéine III<sup>glc</sup> du système PTS augmente, ce qui active l'adénylate cyclase. Le taux d'AMPc augmente, ce qui provoque l'activation de CRP qui va à son tour activer les gènes permettant le transport et l'utilisation de sources de carbone alternatives (Postma et Lengeler, 1996).

## **II.2. La composition macromoléculaire des cellules (ADN, ARN, protéines)**

*E. coli* comporte un nucléoïde constitué d'un chromosome circulaire extrêmement compacté. La structure et la compaction du chromosome sont hautement dynamiques et déterminées par la liaison de nombreuses protéines, dont les concentrations sont régulées en fonction des conditions de croissance. Plusieurs types de protéines sont associées au chromosome : ADN et ARN polymérases, protéines impliquées dans la recombinaison et la réparation de l'ADN, facteurs de transcription ainsi que des protéines de type histone (voir



**Figure 8 : Relations entre taux de croissance, taille des cellules (à gauche), transcription globale (au milieu) et composition cellulaire (à droite) chez *E. coli* B/r en phase de croissance exponentielle (d'après Bremer et Dennis, 1996).** Le taux de croissance définit la composition et la taille des cellules. Plus la vitesse de division est élevée, plus les cellules contiennent une concentration importante de macromolécules organiques et sont volumineuses (à gauche). L'activité transcriptionnelle de la cellule est également dépendante du taux de croissance (au milieu). La fraction totale d'ARNs stables (ARNr et ARNt) augmente avec le taux de croissance. Les ARNm codant les protéines ribosomiques restent à un niveau presque constant et la proportion des autres ARNm diminue. Ainsi la proportion relative d'ARNm codant les protéines ribosomiques parmi la totalité des ARNm augmente considérablement. La composition des cellules en macromolécules organiques varie en fonction de la vitesse de division des bactéries (à droite). La quantité d'ARN augmente avec le taux de croissance, tandis que la concentration en ADN et en protéines diminue.

chapitre IV). Les bactéries contiennent également de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme central ainsi que des ribosomes, dont la concentration intracellulaire est finement régulée en fonction des conditions de croissance. La cellule bactérienne comporte également une concentration importante d'ARN, regroupant ARNm, ARNt et ARNr. La demie-vie des ARNr et ARNt étant très longue, ils sont qualifiés d'ARN stables. Leur concentration est finement régulée au cours du cycle de vie des bactéries. Comme les autres structures cellulaires, la composition du cytoplasme bactérien est modifiée en fonction des conditions de croissance. Les modifications globales de composition intracellulaire sont régulées notamment par la réponse stringente, réseau de régulation permettant l'adaptation aux conditions nutritionnelles.

### **II.2.1. Composition des cellules en phase de croissance exponentielle**

Durant la phase de croissance exponentielle, la composition des bactéries dépend essentiellement de leur taux de croissance (Fig.8) (Bremer et Dennis, 1996). Les cellules contiennent, selon leur vitesse de croissance, jusqu'à 4 équivalents chromosomiques, résultats de cycles simultanés de réplication du chromosome (Bremer et Dennis, 1996). En effet, les intervalles entre 2 cycles de réplication ainsi que le temps nécessaire à la réplication complète du chromosome sont fonction du taux de croissance (Cooper et Helmstetter, 1968 ; Meselson et Stahl, 1958 ; Newman et Kubitschek, 1978). Les cellules contiennent en outre une grande quantité de ribosomes composés entre autres d'ARN stables (ARNr), dont la concentration est également fonction de la vitesse de division des bactéries afin de faire face aux besoins de synthèse protéique (Fig.8).

Cependant, la relation entre le taux de croissance et la concentration des constituants cellulaire diffère selon la nature de ces composés (Bremer et Dennis, 1996). Ainsi, quand la concentration en ARN et en ribosomes s'accroît avec la vitesse de division, le taux d'ADN et la concentration en protéines diminuent. Les proportions des différentes macromolécules changent donc avec le taux de croissance (Fig.8).

Les bactéries à taux de croissance élevé contiendraient de façon générale plus de macromolécules organiques et présenteraient un volume plus important que celles qui se divisent lentement (Schaechter *et al.*, 1958) (Fig.8). La constitution des bactéries peut varier de façon importante : lorsque le temps de génération d'*E. coli* passe de 100 à 24 minutes, le nombre d'ARN polymérase par cellule passe de 1500 à 11000, tandis que le nombre de ribosomes passe de 6800 à 72000. Lorsque le taux de croissance est maximal, la machinerie

de transcription / traduction est ainsi presque entièrement dédiée à sa propre production (Bremer et Dennis, 1996).

Toutefois, des expériences de cytométrie en flux sur des cellules cultivées en systèmes discontinus (batch) rapportent que le contenu en ADN et la taille cellulaire varient au cours de la phase exponentielle (Akerlund *et al.*, 1995). En effet, la concentration en ADN et le volume cellulaire augmentent pendant une période relativement longue après le début de la phase exponentielle et commencent à diminuer bien avant que la phase stationnaire ne soit atteinte, surtout lorsque la croissance s'effectue en milieu riche (Akerlund *et al.*, 1995). Les cellules rencontrent ainsi rarement un état stable qui dure tout au long de la phase de croissance exponentielle même si la densité optique augmente de façon exponentielle. En milieu minimum, il existe une meilleure corrélation entre la fin de l'état stable et la fin de la phase de croissance exponentielle (Akerlund *et al.*, 1995). Ceci peut s'expliquer par la complexité du milieu riche qui, contrairement au milieu minimum, comporte de nombreux substrats s'épuisant à des vitesses différentes.

En phase de croissance exponentielle, le métabolisme cellulaire est très actif (glycolyse, transports de nutriments, synthèse d'acides gras...). Ainsi, le cytoplasme contient une concentration importante d'enzymes permettant à la cellule d'acquérir l'énergie nécessaire pour atteindre une division maximale, par le biais de l'utilisation de substrats carbonés notamment. De plus, la concentration d'enzymes permettant d'élargir l'enveloppe cellulaire est importante.

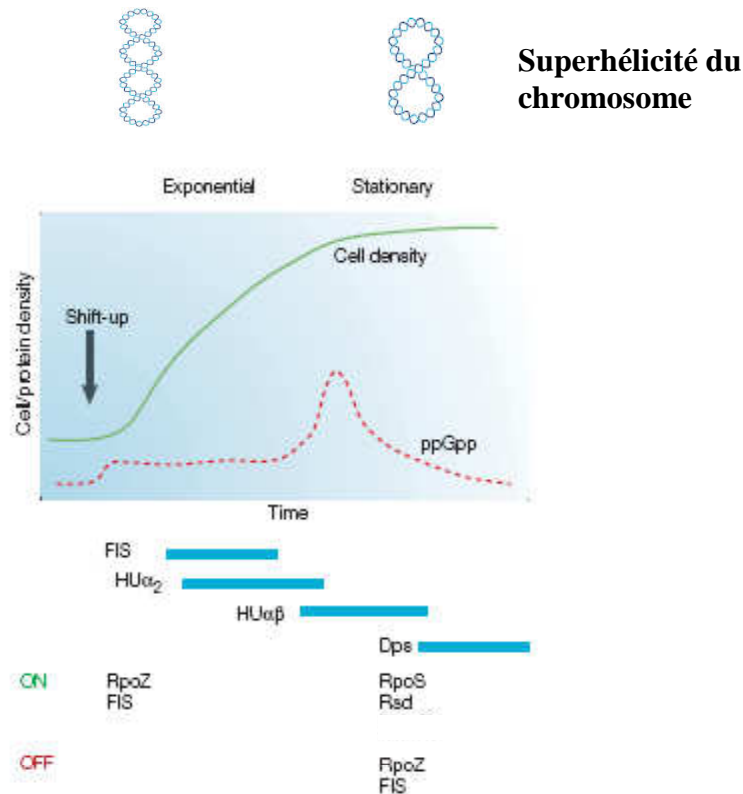
### **II.2.2. La composition cellulaire lors du passage en phase stationnaire**

Lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire, la composition cellulaire change de façon importante (pour revue Huisman *et al.*, 1996) (Fig.2). La croissance se déséquilibre, c'est-à-dire que la synthèse des différentes macromolécules (ARN, ADN, protéines) diminue de façon drastique mais pas synchrone (Bremer et Dennis, 1996). La phase stationnaire est une période très dynamique au cours de laquelle les populations bactériennes sont très hétérogènes. Des cellules cultivées en phase stationnaire prolongée (plus de 10 jours) voient apparaître de nombreuses mutations permettant l'adaptation des cellules aux carences prolongées. Ceci entraîne la coexistence de nombreuses sous-populations, permettant ainsi d'augmenter la diversité génétique (Finkel et Kolter, 1999, Reeve *et al.*, 1984). Une population en phase stationnaire peut en effet être divisée en plus de 10 sous-populations différant par leur densité cellulaire (Makinoshima *et al.*, 2002). D'autre

part, la composition des bactéries en phase stationnaire diffère selon le moment de prélèvement de l'échantillon ou le milieu de culture utilisé. Par exemple, des cellules cultivées en milieu riche entrent souvent en phase stationnaire avec deux à quatre équivalents chromosomiques, alors que des bactéries cultivées en milieu minimum glucose n'ont souvent qu'un à deux chromosomes par cellule (Akerlund *et al.*, 1995).

De façon globale, lors de la transition entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire, les cellules deviennent sphériques grâce à des modifications de l'enveloppe cellulaire, décrites plus haut (Fig.2). Le métabolisme global est modifié de façon à conserver le maximum d'énergie pour permettre la survie des cellules. Des substances de réserve s'accumulent dans le cytoplasme (polyphosphates, glycogène...), contribuant à augmenter le ratio poids/volume (Makinoshima *et al.*, 2003). D'autre part, les protéines associées au nucléoïde changent (Ishihama, 2000). La protéine Dps devient très abondante et polymérise sur le chromosome, ce qui permet de protéger l'ADN des dommages oxydatifs et entraîne sa compaction (Figs.9 et 21) (Grant *et al.*, 1998 ; Frenkiel-Krispin *et al.*, 2004 ; Zhao *et al.*, 2002). Les appareils transcriptionnel et traductionnel subissent des modifications importantes en phase stationnaire ce qui provoque une modification de l'expression globale des gènes. La concentration relative du facteur sigma alternatif  $\sigma^S$  augmente, permettant la transcription de gènes spécifiques de la phase stationnaire (Ishihama, 2000 ; Reeve *et al.*, 1984). La traduction globale devient moins active, ce qui est dû à la dimérisation d'une partie des ribosomes, dont le coefficient de sédimentation passe de 70S à 100S, sous l'action du facteur de modulation des ribosomes (RMF) (Wada *et al.*, 2000, 1990 ; Yamagishi *et al.*, 1993). Ce phénomène est dû à l'action de (p)ppGpp, l'effecteur de la réponse stringente (Izutsu *et al.*, 2001).

Les changements de composition cellulaire en phase stationnaire sont le résultat de l'action concertée de plusieurs régulateurs globaux de l'expression des gènes. La diminution drastique de synthèse des protéines et des ARN stables, représentant 90% des ARN totaux en période de croissance, est due majoritairement à l'action de (p)ppGpp, l'effecteur de la réponse stringente. D'autre part, la concentration de la protéine Fis, activant la transcription des ARN stables (Zhi *et al.*, 2003), diminue de façon importante en phase stationnaire, également sous l'influence de (p)ppGpp. Cependant, la quantité d'ARN stables, soumise à un contrôle en fonction du taux de croissance, diminue même en absence de ces facteurs (Aviv *et al.*, 1996). Lors du passage en phase stationnaire, l'accumulation de (p)ppGpp contribue également à modifier les machineries transcriptionnelle et traductionnelle. Ceci a un impact sur la synthèse de substances de réserve et sur la structure du nucléoïde notamment. La



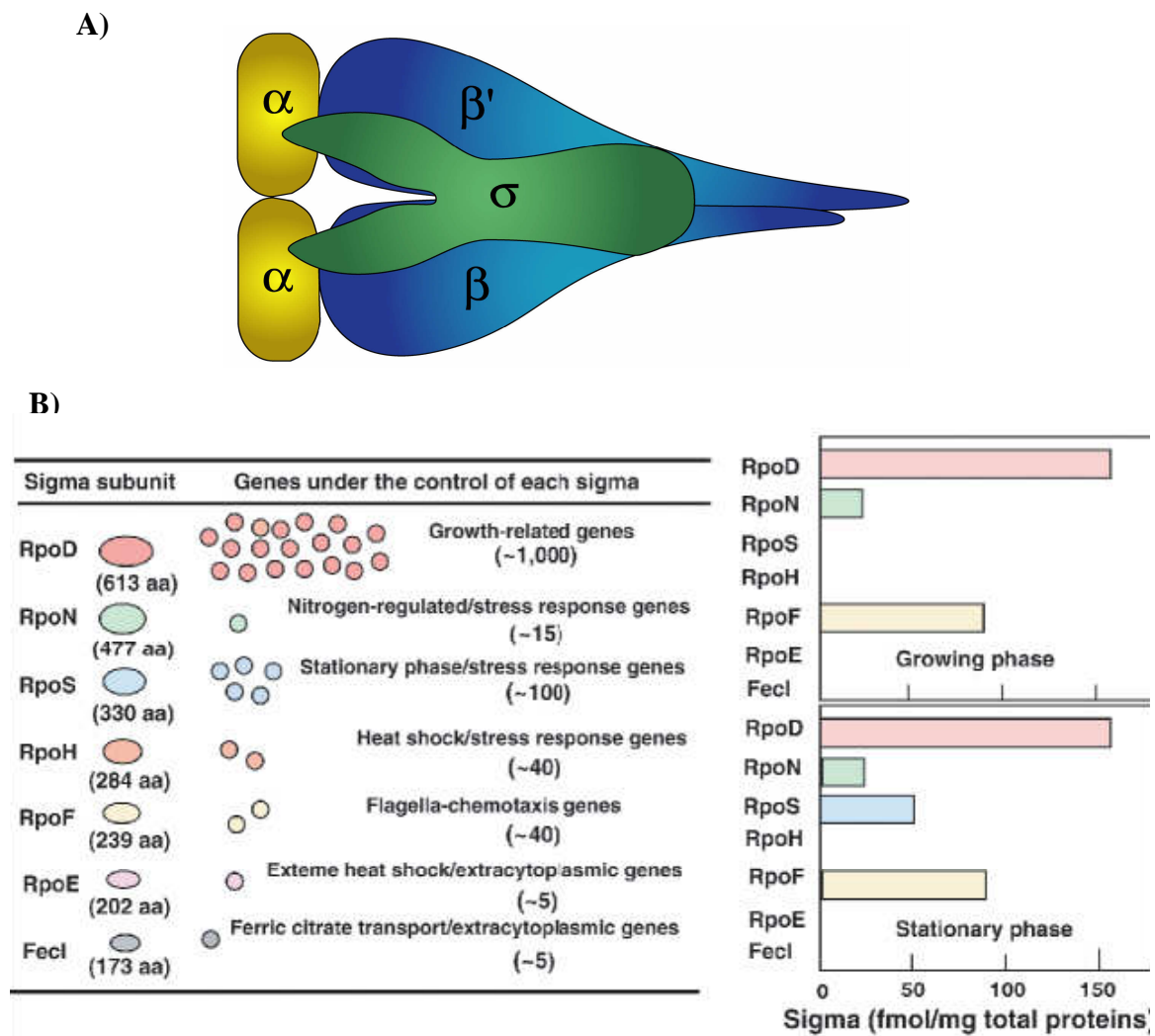
**Figure 9 : Composition de l'ARN polymérase holoenzyme et des protéines associées au nucléoïde durant le cycle de croissance d'*E. coli* (d'après Travers et Muskhelishvili, 2005).** Les variations de densité cellulaire et de concentration de (p)ppGpp, l'effecteur de la réponse stringente, au cours du cycle de croissance sont indiquées respectivement en traits continu et pointillé. La superhélicité du chromosome selon les phases de croissance est indiquée au dessus du graphique. Sous le graphique sont indiqués les principaux modulateurs de la superhélicité du chromosome et de la transcription, le trait bleu signale la phase de croissance au cours de laquelle ils sont exprimés. Fis et HU : facteurs de transcription et protéines associées au nucléoïde. La composition de la protéine HU varie selon la phase de croissance. Dps : protéine associée au nucléoïde, compactant et protégeant l'ADN en phase stationnaire. RpoZ : sous-unité oméga de l'ARN polymérase, dont la fonction est peu connue. RpoS : facteur sigma spécifique de la phase stationnaire. Rsd : protéine anti-facteur sigma 70.

topologie de l'ADN joue également un rôle important. La superhélicité du chromosome diminue en phase stationnaire, ce qui est connu pour influencer l'expression des gènes (Balke et Gralla, 1987 ; Dorman *et al.*, 1988 ; Schneider *et al.*, 1999 ; Peter *et al.*, 2004).

### **II.3. L'expression globale des gènes en fonction des conditions de croissance**

L'intégralité de la composition et de la structure cellulaire (membrane externe, peptidoglycane, membrane plasmique, cytoplasme...) fluctue en fonction des conditions environnementales, notamment lors de stress et de carences. Les cellules sont en effet capables de détecter les modifications de l'environnement et réagissent en ajustant l'expression globale de leurs gènes, ce qui leur permet de s'adapter aux nouvelles conditions de croissance. La modification de l'expression des gènes intervient principalement au niveau transcriptionnel. En effet, de nombreuses analyses de transcription globale révèlent des modifications importantes du transcriptome d'*E. coli* selon le type de milieu de culture (Tao *et al.*, 1999), ou le stade de croissance (Tani *et al.*, 2002 ; Beloin *et al.*, 2004). Le transcriptome subit également de larges variations lorsque les cellules rencontrent une carence en soufre ou en azote (Gyaneshwar *et al.*, 2005), un stress osmotique (Cheung *et al.*, 2003), oxydatif (Zheng *et al.*, 2001) ou thermique (Riehle *et al.*, 2003). L'expression des gènes peut également être régulée au niveau post-transcriptionnel avec une modulation de la stabilité des ARNm ou l'intervention de petits ARN non codants ainsi qu'au niveau post-traductionnel, par modulation de la stabilité des protéines. Cependant, dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus spécifiquement à la régulation de la transcription globale via une modification de l'activité de l'ARN polymérase en fonction des conditions de croissance.

La transcription globale est principalement régulée à deux niveaux. D'une part, l'activité de l'ARN polymérase est souvent modulée par des protéines régulatrices qui se fixent à l'ADN au niveau de séquences cibles proches du promoteur. Les répresseurs peuvent agir par compétition en bloquant la fixation de l'ARN polymérase au promoteur, tandis que les activateurs peuvent favoriser cette interaction en induisant par exemple une courbure de l'ADN. Ils affectent majoritairement l'étape d'initiation de la transcription. Les régulateurs de la transcription sont souvent exprimés différemment selon les conditions de croissance, ce qui permet à la cellule d'adapter sa transcription globale aux conditions environnementales (Fig.9). Il existe de nombreux facteurs de transcription. Par exemple, les systèmes régulateurs



**Figure 10 : Constitution de l'ARN polymérase selon les conditions de croissance. A) ARN polymérase d'*E. coli*.** L'holoenzyme est constituée de cinq sous-unités : deux sous-unités  $\alpha$  impliquées dans l'assemblage du coeur enzymatique et la reconnaissance du promoteur,  $\beta$  et  $\beta'$  sont les sous-unités catalytiques et  $\sigma$  permet la reconnaissance spécifique du promoteur. **B) Les différentes sous-unités  $\sigma$  de l'ARN polymérase d'*E. coli* et leur concentration selon les conditions de croissance (d'après Ishihama, 2000).** L'ARN polymérase doit être associée à l'une des sept sous-unités  $\sigma$  d'*E. coli* pour initier la transcription. L'ARN polymérase associée à chacune des sous-unités  $\sigma$  peut diriger spécifiquement la transcription de différents groupes de gènes selon les conditions de croissance. Sur ce schéma sont indiqués la concentration intracellulaire des facteurs sigmas en phase de croissance exponentielle et en phase stationnaire, ainsi que le nombre et le type de gènes régulés par chacun des facteurs.



à deux composantes modifient la transcription de quelques gènes en réponse à des conditions spécifiques de l'environnement. La protéine senseur détecte ces conditions et active la protéine régulatrice par phosphorylation, qui elle-même active l'expression de ses gènes cibles. Peu de facteurs de transcription ont un effet global sur l'expression des gènes et peuvent être qualifiés de régulateurs globaux. Parmi ceux-ci peut être citée la protéine CRP (cAMP receptor protein), activée lors de carences en glucose par augmentation de la concentration d'AMPc. Cette protéine régule l'expression de 197 gènes impliqués dans des fonctions très diverses comme le catabolisme (répression catabolique) et la réponse aux stress (Martinez-Antonio et Collado-Vides, 2003). La protéine Fis (factor for inversion stimulation) très abondante lors de l'entrée en phase exponentielle (Ali *et al.*, 1999) (Fig.9), est impliquée dans la reprise de la croissance en modulant l'expression de nombreux gènes, notamment la transcription des ARN stables (Bokal *et al.*, 1995 ; Muskhelishvili *et al.*, 1995 ; Zhang et Bremer, 1996 ; Xu et Johnson, 1995). Le régulateur transcriptionnel Lrp permettrait de coordonner l'état métabolique de la cellule avec l'état nutritionnel de l'environnement par modification de l'expression de plus de 10% des gènes d'*E. coli* (Tani *et al.*, 2002). Le niveau de la protéine Lrp semble en effet inversement proportionnel à la concentration de nutriments du milieu de culture (Landgraf *et al.*, 1996).

La transcription globale de la cellule est également modulée par modification de la composition de l'ARN polymérase en fonction des conditions de croissance. Cette enzyme est formée de deux sous-unités  $\alpha$  (codées par *rpoA*), d'une sous-unité  $\beta$  (codée par *rpoB*), d'une sous-unité  $\beta'$  (codée par *rpoC*), et d'une sous-unité  $\sigma$  (Fig.10). L'holoenzyme peut être dissociée en cœur-enzyme ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) et facteur  $\sigma$  (Murakami *et al.*, 2002). La spécificité de reconnaissance des promoteurs (boîtes -10 et -35) par l'ARN polymérase est déterminée par la sous unité  $\sigma$ . Sept facteurs  $\sigma$  différents ont été identifiés chez *E. coli* (Gross *et al.*, 1998 ; Helmann et Chamberlin, 1988) (Fig.10). Chacun participe à la transcription spécifique d'un ensemble de gènes permettant à la bactérie de répondre aux différents stimuli environnementaux et aux conditions physiologiques (Fig.10). Ces facteurs sont répartis en deux classes. Le facteur sigma végétatif  $\sigma^{70}$ , codé par *rpoD*, contrôle la transcription de la plupart des gènes dits de « ménage », impliqués dans les fonctions fondamentales de la cellule (Gross *et al.*, 1998 ; Helmann et Chamberlin, 1988 ; Jishage et Ishihama, 1995 ; Jishage *et al.*, 1996). Les six autres facteurs sigmas dits alternatifs permettent à la cellule de répondre à divers stress (Fig.10). La protéine RpoN ( $\sigma^N$ ) permet de répondre aux carences en azote,

tandis que les facteurs RpoE ( $\sigma^E$ ) et RpoH ( $\sigma^H$ ) permettent de résister aux chocs thermiques plus ou moins extrêmes. Les facteurs RpoF ( $\sigma^F$ ) et FecI activent respectivement l'expression de gènes impliqués dans le chimiotactisme et dans le transport du citrate ferrique (pour revue Ishihama, 2000) (Fig.10). Enfin, RpoS ( $\sigma^S$ ) joue un rôle global dans la régulation de l'expression génique et permet aux cellules de faire face à des conditions de stress très diverses (carence en nutriments, irradiations aux ultraviolets, choc osmotique, variations de température, pH acide, stress oxydatif...) (Hengge-Aronis, 2002). Quasi absent en conditions de croissance optimales, RpoS voit sa concentration augmenter considérablement en phase stationnaire et lors de stress (Jishage et Ishihama, 1995) (Fig.10). L'expression de  $\sigma^S$  est un processus hautement régulé à toutes les étapes de sa biosynthèse, mais surtout au niveau post-transcriptionnel (Hengge-Aronis, 2002 ; Brown et Elliott, 1996 ; Lange et Hengge-Aronis, 1994 ; Loewen *et al.*, 1993).

En phase de croissance exponentielle, l'ARN polymérase cœur est essentiellement liée au facteur sigma végétatif  $\sigma^{70}$ , remplacé en phase stationnaire et en conditions de stress par les facteurs alternatifs adaptés aux conditions rencontrées (Fig.10). Ceci permet de réorienter l'ARN polymérase vers les gènes impliqués dans la réponse aux conditions auxquelles sont soumises les cellules. Les différents facteurs  $\sigma$  entrent en compétition pour se complexer au cœur-enzyme, présent en quantité limitante dans la cellule. L'activité des facteurs  $\sigma$  est donc déterminée par leur concentration intracellulaire et leur affinité pour le cœur-enzyme (Ishihama, 2000). Cependant, en phase stationnaire,  $\sigma^{70}$  reste le facteur prédominant et possédant la plus forte affinité pour l'ARN polymérase (Jishage et Ishihama, 1995 ; Jishage *et al.*, 1996) (Fig.10). Chez *E. coli*, l'association des facteurs  $\sigma$  alternatifs avec le cœur-enzyme de l'ARN polymérase semble être facilitée par Rsd (regulator of sigma D). Il s'agit d'un facteur anti-sigma capable de s'associer spécifiquement avec  $\sigma^{70}$ . Il l'empêche alors de se complexer à l'ARN polymérase et de transcrire ses gènes cibles (Jishage et Ishihama, 1998). L'induction de l'expression de Rsd en phase stationnaire permet donc une réduction de l'activité de  $\sigma^{70}$  et favorise indirectement celle des facteurs  $\sigma$  alternatifs (Fig.10) (Jishage et Ishihama, 1999 ; Jishage *et al.*, 2002 ; Laurie *et al.*, 2003). L'effecteur de la réponse stringente (p)ppGpp joue un rôle primordial dans la reprogrammation de l'ARN polymérase en phase stationnaire. D'une part, (p)ppGpp semble favoriser l'association des facteurs  $\sigma$  alternatifs, notamment  $\sigma^S$ ,  $\sigma^N$  et  $\sigma^H$  au cœur-enzyme en déstabilisant la liaison de  $\sigma^{70}$  (Hernandez et Cashel, 1995 ; Jishage et al., 2002 ; Laurie et al., 2003) (Fig.18). D'autre part, (p)ppGpp active l'expression de RpoS et de Rsd.

L'effecteur de la réponse stringente, (p)ppGpp participe également de façon directe au remaniement de la transcription globale en phase stationnaire en se liant à l'ARN polymérase et en inhibant l'initiation de la transcription au niveau des promoteurs d'ARN stables. Il permet également l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés, dans la résistance aux carences et aux stress. Le rôle de (p)ppGpp est détaillé dans le chapitre suivant.

Les cellules étant très souvent soumises à des environnements fluctuants, elles doivent être capables de s'y adapter en modifiant rapidement l'expression globale de leurs gènes. Ceci nécessite l'intervention de réseaux de régulation globale qui permettent de détecter les fluctuations de l'environnement et les transmettent à l'ARN polymérase, en modifiant sa composition ou la concentration des régulateurs transcriptionnels. Deux réseaux majeurs très conservés interviennent dans ce type de régulation : la réponse stringente et la topologie de l'ADN. Ces deux réseaux sont présentés dans les deux chapitres suivants.

### III. La réponse stringente

---

Lorsque les bactéries sont confrontées à des carences nutritionnelles, l'expression globale de leurs gènes est modifiée de façon à inhiber leur croissance, économiser de l'énergie et assurer leur survie jusqu'à la fin de la carence. La synthèse des protéines et des acides nucléiques, notamment les ARN stables, diminue tandis que la dégradation protéique et la synthèse d'acides aminés augmentent. Ce phénomène global est le résultat de l'intervention d'un réseau de régulation très complexe, appelé « réponse stringente », dont les effecteurs sont deux molécules signal : les nucléotides guanosine penta- et tétraphosphate, regroupés sous l'abréviation (p)ppGpp. Lors de carences, ces molécules sont synthétisées et modifient la transcription globale. D'une part, elles inhibent la transcription des ARN stables, stoppant ainsi la croissance. D'autre part, elles activent la transcription de gènes nécessaires à la survie, par exemple les gènes de biosynthèse d'acides aminés. Quand les conditions redeviennent favorables, ces molécules sont dégradées et la croissance peut alors redémarrer.

La réponse stringente est un phénomène ubiquitaire chez les eubactéries, impliqué dans nombre de mécanismes liés à des stress : la virulence chez *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* et *Staphylococcus aureus* (Taylor *et al.*, 2002 ; Hammer et Swanson, 1999 ; Cassels *et al.*, 1995), la formation de biofilms chez *Streptococcus mutans* (Lemos *et al.*, 2004), la production d'antibiotiques chez *Streptomyces* (Hesketh *et al.*, 2001), la réponse aux carences nutritionnelles chez *E. coli* (Cashel *et al.*, 1996),... Des processus similaires, intervenant également dans la résistance aux stress, ont été mis en évidence chez les plantes *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum* (Van der Biezen *et al.*, 2000 ; Givens *et al.*, 2004).

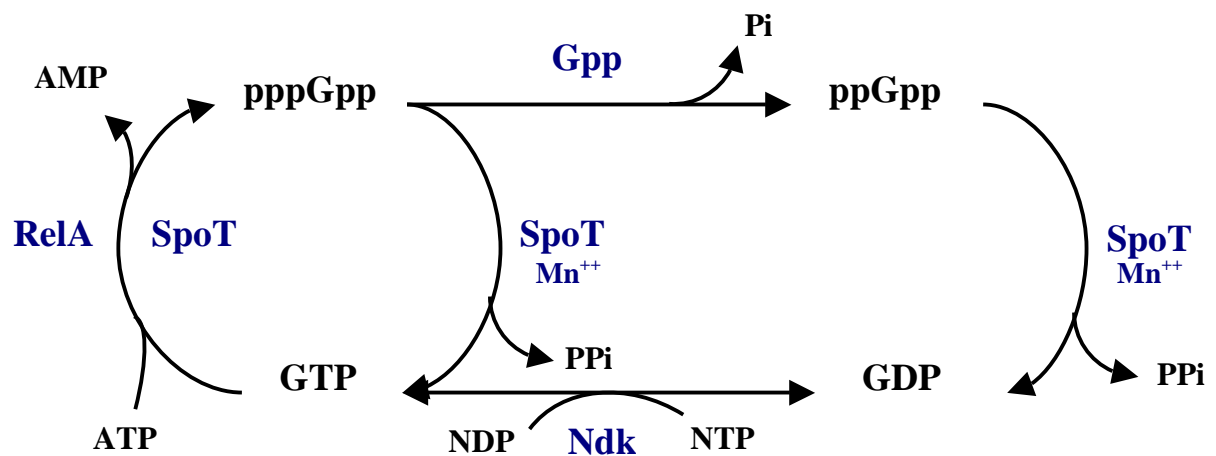
#### III.1. Historique

En 1952, Sands et Roberts ont découvert que la concentration en ARN stables diminuait chez *E. coli* lors de carences en acides aminés, ce phénomène ayant été appelé « contrôle stringente ». Des mutants de souches bactériennes dans lesquels le niveau d'ARN stables ne diminue pas pendant ce type de carence ont été recherchés. Des analyses génétiques de ces mutants, dits « relâchés », ont permis de mettre en évidence le gène *relA* (pour réponse relâchée), impliqué dans ce phénomène (Alfoldi *et al.*, 1962 ; Borek *et al.*, 1956).

En 1969, Cashel et Gallant ont recherché les effecteurs impliqués dans ce mécanisme. Des souches *relA*<sup>+</sup> et *relA*<sup>-</sup> ont été soumises à une carence en acides aminés, notamment par utilisation de sérine hydroxamate qui crée une carence en ARNt chargés en sérine. Le contenu de ces souches a été étudié grâce à un marquage cellulaire suivi de l'analyse des métabolites par chromatographie sur couche mince. Deux spots spécifiques des souches *relA*<sup>+</sup> et appelés « Magic Spots I et II » (MSI et MSII) ont été mis en évidence puis identifiés : il s'agit des nucléotides ppGpp et pppGpp. Ils s'accumulent en réponse à une carence en acides aminés et leur concentration est inversement proportionnelle au taux de croissance des cellules (Lazzarini *et al.*, 1971). En 1972, Haseltine *et al.* ont prouvé que l'activité de synthèse de (p)ppGpp par RelA était liée aux ribosomes. En effet, l'utilisation de fractions ribosomiques *in vitro* est suffisante pour synthétiser (p)ppGpp. De plus, RelA peut être purifiée à partir de ces fractions (Cochran et Byrne, 1974). En 1973, Haseltine et Block ont constaté que l'accumulation de (p)ppGpp via RelA est due à la présence d'ARNt non chargés en acides aminés au niveau des ribosomes (Haseltine et Block, 1973).

En 1963, Neidhardt a démontré que des mutants relâchés *relA* sont tout de même capables de restreindre l'accumulation d'ARN stables lors de carences en sources de carbone. Ceci a été confirmé en 1971 par Lazzarini, Cashel et Gallant qui ont constaté que les souches relâchées sont capables de synthétiser (p)ppGpp lors de carences différentes d'un manque d'acides aminés (Lazzarini *et al.*, 1971 ; Friesen *et al.*, 1978 ; Atherly, 1979 ; Metzger *et al.*, 1989). Il existe donc au moins une seconde source de (p)ppGpp indépendante de RelA. En 1974, Laffler et Gallant ont cartographié le gène *spoT*. Une délétion simultanée de *relA* et *spoT* supprime complètement l'accumulation de (p)ppGpp dans les cellules (Xiao *et al.*, 1991). La protéine SpoT permettrait donc également la synthèse de (p)ppGpp, mais pas dans les mêmes conditions de carence que RelA.

Certains mutants *spoT* ont été très étudiés en laboratoire. Le mutant *spoT1* présente un niveau basal de ppGpp plus élevé (Laffler et Gallant, 1974) et une croissance plus lente, inversement proportionnelle au niveau de ppGpp atteint. Les allèles mutants *spoT202*, *203* et *204* sont létaux dans un hôte *relA*<sup>+</sup> et présentent un niveau encore plus élevé de ppGpp, toxique pour les cellules (Sarubbi *et al.*, 1989). Ces mutations ont permis de mettre en évidence l'implication de SpoT dans la dégradation de (p)ppGpp. Les allèles mutants utilisés touchent en effet l'activité d'hydrolyse de (p)ppGpp (Xiao *et al.*, 1991), provoquant ainsi l'accumulation de (p)ppGpp. Ceci inhibe la croissance cellulaire, probablement via l'inhibition de transcription des ARN stables.



**Figure 11 : Métabolisme de (p)ppGpp (d'après Cashel *et al*, 1996).**

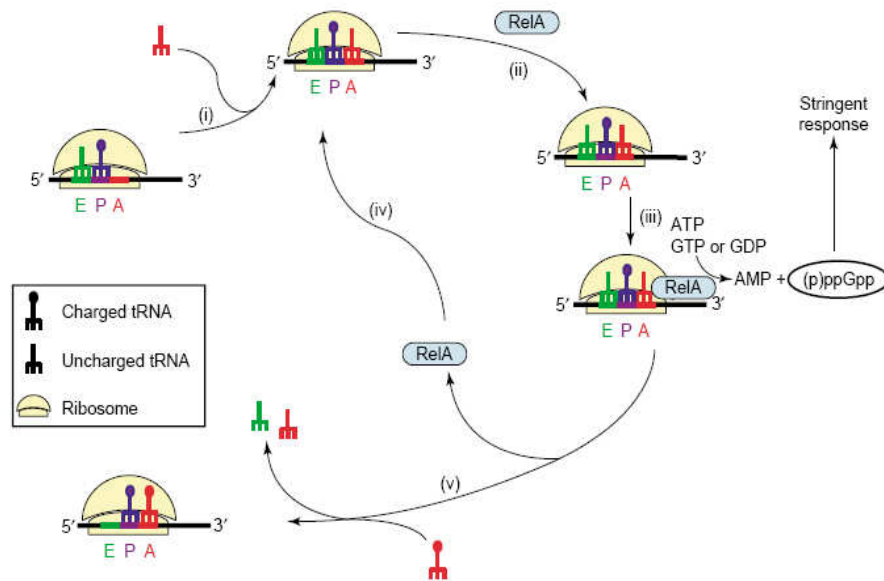
Le nucléotide pppGpp est synthétisé grâce à RelA et SpoT (GTP pyrophosphokinases) à partir de GTP et d'ATP. Il est converti en ppGpp grâce à la (p)ppGpp 5' phosphohydrolase (Gpp). Le nucléotide ppGpp peut être également synthétisé à partir de GDP et d'ATP (GDP étant en concentration faible dans la cellule, ceci n'est pas représenté sur ce schéma). Les nucléotides (p)ppGpp sont dégradés grâce à l'activité (p)ppGpp 3' pyrophosphohydrolase de SpoT, avec relargage de pyrophosphate. Enfin, GDP est converti en GTP grâce à la nucleoside 5' diphosphate kinase (Ndk).

Des doubles mutants *relA spoT* dépourvus de (p)ppGpp (dits (p)ppGpp<sup>0</sup>) sont polyauxotrophes (Xiao *et al.*, 1991). Leur croissance nécessite la présence d'acides aminés dans le milieu de culture. De nombreuses études ont en effet démontré l'importance de (p)ppGpp dans l'activation de la transcription des gènes de biosynthèse des acides aminés (Venetianer, 1968, 1969 ; Williams et Rogers, 1987 ; Zidwick *et al.*, 1984). L'absence de (p)ppGpp empêche donc les cellules de pallier aux carences en acides aminés. Les mutants (p)ppGpp<sup>0</sup> présentent également une sensibilité particulière à la présence simultanée de sérine, méthionine et glycine dans le milieu de culture (milieu SMG). Ceci est dû au fait qu'un excès de sérine réprime l'expression de l'opéron *ilv*, ce qui provoque une carence en isoleucine, acide aminé nécessaire à la croissance des souches (p)ppGpp<sup>0</sup> (Uzan et Danchin, 1978). Cette sensibilité peut être réversée par ajout d'isoleucine. Enfin, les souches dépourvues de (p)ppGpp sont sensibles à l'aminotriazole (AT), qui provoque une carence en histidine en inhibant sa biosynthèse.

## **III.2. Les acteurs de la réponse stringente**

### **III.2.1. Le métabolisme de (p)ppGpp**

Les nucléotides phosphatés guanosine pentaphosphate (pppGpp) et guanosine tétraphosphate (ppGpp) sont les effecteurs principaux de la réponse stringente (Cashel et Gallant, 1969). Lors de carences, ils sont synthétisés respectivement à partir de GTP et GDP, l'ATP étant utilisé comme donneur de phosphate (Fig.11). Les enzymes responsables de cette production sont RelA ou SpoT selon le type de carence rencontré par les cellules (voir sections III.2.2 et III.2.3). Le niveau cellulaire de GDP étant plus faible que le niveau de GTP, la cellule synthétise de façon majoritaire pppGpp. Ce nucléotide est immédiatement converti en ppGpp par la guanosine pentaphosphatase (Gpp) ou en GTP par SpoT. La concentration de ppGpp est donc finalement plus importante que celle de pppGpp. En fin de carence, ces métabolites sont dégradés par la protéine SpoT qui produit alors du GTP ou du GDP et du pyrophosphate (Cashel *et al.*, 1996) (Fig.11). La concentration intracellulaire de (p)ppGpp est inversement proportionnelle au taux de croissance. Elle augmente rapidement à la suite de carences, pour atteindre une concentration de l'ordre de 1mM (Cashel et Gallant, 1969). Lorsque les conditions redeviennent favorables à la croissance, la concentration de (p)ppGpp



**Figure 12 : Mécanisme de synthèse de (p)ppGpp par RelA associée aux ribosomes (d'après Braeken *et al.*, 2006).** (i) Lors de carences en acides aminés, des ARNt non chargés se lient au site accepteur des ribosomes, ce qui provoque leur arrêt. (ii) La protéine RelA détecte les ribosomes en pause, (iii) s'y lie et synthétise (p)ppGpp. (iv) La protéine RelA est alors libérée et va se lier à un autre ribosome bloqué. La concentration de (p)ppGpp augmente jusqu'à activer la réponse stringente. (v) En fin de carence, des ARNt chargés remplacent les ARNt non chargés et la traduction reprend.



diminue rapidement. La demi-vie de (p)ppGpp chez *E. coli* K12 est d'environ 30 secondes (Cashel *et al.*, 1996).

### **III.2.2. RelA**

#### **III.2.2.1. RelA et la synthèse de (p)ppGpp**

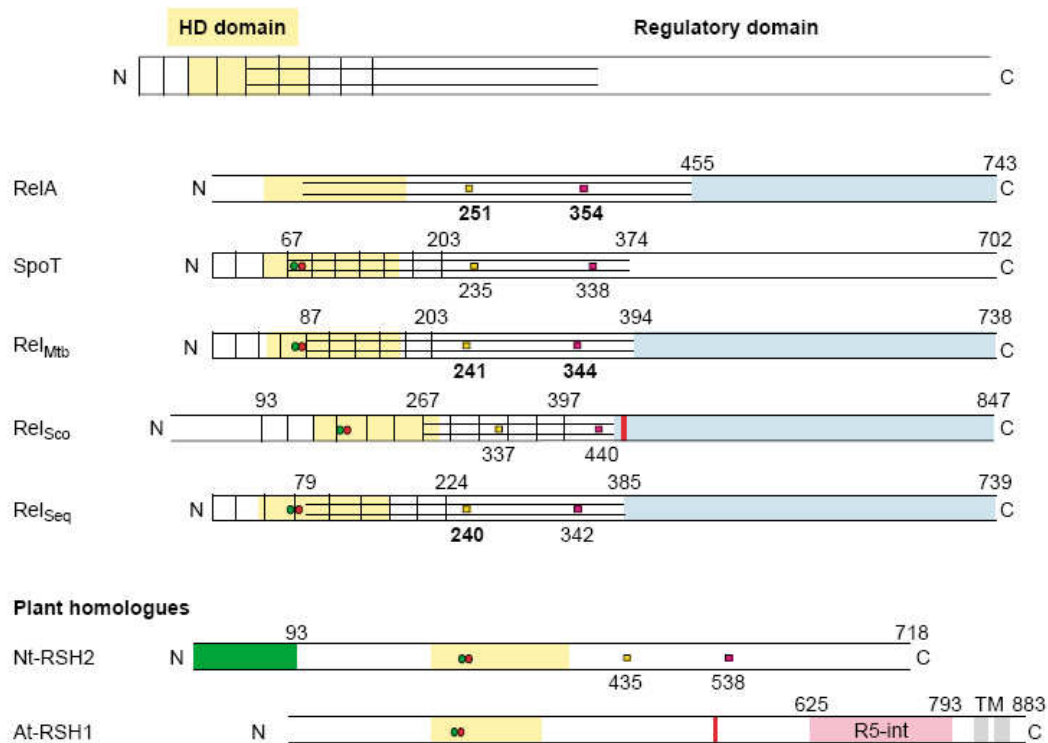
La protéine RelA (84 Kda, 743 aa) est la (p)ppGpp synthase principale ou PSI. Elle catalyse le transfert des phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP au GTP en position 3'OH du ribose, lors de carences en acides aminés (Figs.11 et 12) (Cochran et Byrne, 1974 ; Lipmann et Sy, 1976). Cette protéine est associée à la sous-unité 50S des ribosomes (Cochran et Byrne, 1974 ; Haseltine *et al.*, 1972 ; Haseltine et Block, 1973 ; Pedersen et Kjeldgaard, 1977).

Lors d'une carence en acides aminés, l'aminacylation des ARNt ne peut pas combler les besoins de synthèse protéique. Des ARNt non chargés se fixent alors au niveau du site accepteur des ribosomes et ceux-ci s'immobilisent lors de l'élongation protéique. La protéine RelA détecte les ribosomes bloqués, s'y fixe et synthétise (p)ppGpp (Richter, 1976) (Fig.12). Cette synthèse provoque la libération de RelA qui va se fixer sur un autre ribosome bloqué où l'opération recommence, conduisant au niveau de (p)ppGpp requis pour déclencher la réponse stringente (Fig.12). Cette capacité de RelA à agir de façon répétitive implique que la quantité de RelA n'est pas nécessairement élevée dans la cellule lors d'une carence en acides aminés. En effet, il a été démontré que seuls 1% des ribosomes étaient liés à RelA lors d'une carence (Pedersen et Kjeldgaard, 1977). De plus, l'expression du gène *relA* semble constitutive et aucune régulation n'a été mise en évidence chez *E. coli* (Cashel *et al.*, 1996).

Le rapport intracellulaire ARNt chargés / ARNt non chargés est donc le signal cellulaire qui déclenche la synthèse RelA-dépendante de (p)ppGpp. L'accumulation de (p)ppGpp inhibe alors la synthèse des ARN stables et donc des ribosomes, provoquant une baisse de la traduction et donc de l'utilisation des acides aminés. Ceci permet d'adapter le fonctionnement des ribosomes à la disponibilité en acides aminés. De plus, (p)ppGpp active la biosynthèse des acides aminés, ce qui permet de pallier à la carence.

#### **III.2.2.2. Caractérisation fonctionnelle de RelA**

Le gène *relA* entier et la partie 5' du gène *relA* comportant les 455 premiers codons ont été clonés séparément dans un plasmide sous contrôle du promoteur *Ptac*. Ceci



**Figure 13 : Organisation des protéines RelA, SpoT et de leurs homologues bifonctionnels identifiés chez les bactéries et les plantes (d'après Braeken *et al.*, 2006).** La première ligne représente la synthèse des domaines observés chez les différents homologues. Les différentes protéines contiennent un domaine N-terminal catalytique et un domaine régulateur C-terminal. Les résidus acides aminés délimitant les domaines sont indiqués au dessus de chaque schéma. L'activité d'hydrolyse de (p)ppGpp est représentée par des barres verticales, l'activité de synthèse par des barres horizontales. Les deux activités se chevauchent chez SpoT et les homologues bifonctionnels. Les résidus conservés His-Asp impliqués dans l'activité d'hydrolyse sont indiqués dans le domaine HD (cercles). Les carrés représentent les résidus impliqués dans la liaison des nucléotides. Un motif P-loop (rouge) est trouvé seulement chez *Streptomyces coelicolor* et l'homologue At-RSH1. Le domaine N-terminal de Nt-RSH2 inclut une séquence potentielle de transit plastidial (en vert). Le domaine représenté en rose chez At-RSH1 est prédit pour être impliqué dans une interaction avec la protéine RPP5, les domaines en gris sont potentiellement transmembranaires. Le domaine C-terminal de la plupart des homologues bactériens semble impliqué dans la liaison aux ribosomes (en bleu). RelA et SpoT sont issus d'*E. coli*. Mtb: *Mycobacterium tuberculosis*, Seq: *Streptococcus equisimilis*, Sco: *Streptomyces coelicolor*, At: *Arabidopsis thaliana*; Nt: *Nicotiana tabacum*.

permet respectivement la production de la protéine RelA entière et de la partie N-terminale de RelA (RelA') (Schreiber *et al.*, 1991). L'induction de l'expression de l'une ou l'autre de ces deux protéines par ajout d'IPTG induit l'accumulation de (p)ppGpp. L'activité catalytique de synthèse de (p)ppGpp est donc située dans la partie N-terminale (NTD) de RelA (Fig.13). La protéine RelA entière répond à une carence en acides aminés de façon dépendante de la présence d'ARNt non chargés au niveau des ribosomes. La protéine tronquée RelA' possède quant à elle une activité constitutive de synthèse, indépendante de la présence d'ARNt non chargés (Svitil *et al.*, 1993). Il a par ailleurs été démontré que les acides aminés très conservés G251 et H354 (Martinez-Costa *et al.*, 1996) sont impliqués dans la liaison à l'ATP et au GTP et sont nécessaires à l'activité catalytique de RelA (Gropp *et al.*, 2001) (Fig.13).

Le fragment C-terminal (CTD) (aa 456 à 744) de RelA est quant à lui dépourvu d'activité de synthèse de (p)ppGpp (Schreiber *et al.*, 1991) (Fig.13). En revanche, sa surexpression dans une souche *relA*<sup>+</sup> empêche l'accumulation de (p)ppGpp, probablement en exerçant un effet dominant négatif. Le domaine C-terminal pourrait donc être impliqué dans la régulation de l'activité de synthèse de RelA. Une mutation des résidus cystéines 612 et 638, ou asparagine 637, situés dans une partie conservée de la protéine (aa 612 à 638) élimine cet effet dominant négatif (Gropp *et al.*, 2001). L'utilisation d'un système de double hybride bactérien (Karimova *et al.*, 1998) a révélé des interactions entre des monomères de RelA par l'intermédiaire du CTD, impliquant les résidus 612, 637 et 638 (Gropp *et al.*, 2001). L'activation de la synthèse de (p)ppGpp par RelA pourrait ainsi être liée à son état d'oligomérisation, la forme monomérique étant la forme active (Gropp *et al.*, 2001). La surexpression du CTD de RelA entraînerait son oligomérisation avec la protéine RelA entière, empêchant ainsi l'activation de RelA. Ce phénomène serait responsable de l'effet dominant négatif exercé par le CTD (Gropp *et al.*, 2001).

### **III.2.3. SpoT**

#### **III.2.3.1. SpoT et le métabolisme de (p)ppGpp**

La protéine SpoT, aussi appelée PSII ((p)ppGpp synthase secondaire) (79 Kda, 702 aa) est une enzyme bifonctionnelle possédant à la fois les activités de synthèse (3' pyrophosphotransférase avec GTP comme accepteur) (Xiao *et al.*, 1991) et de dégradation (3' pyrophosphohydrolase) de (p)ppGpp (Figs.11 et 13). L'activité majeure de SpoT est la dégradation de (p)ppGpp par clivage du 3'-pyrophosphate de (p)ppGpp, ce qui libère du GTP

ou du GDP. Cette activité requiert du manganèse (Fig.11) et est stimulée par le magnésium et l'ATP (Heinemeyer *et al.*, 1978 ; Sy, 1980).

La localisation intracellulaire de la protéine SpoT est sujette à controverse. Elle a d'abord été trouvée associée à une fraction ribosomique (Heinemeyer et Richter, 1977), puis à la membrane plasmique (Sy, 1980 ; Tetu *et al.*, 1980). Une autre étude par gradients de sucrose tend en fait à prouver qu'elle est cytosolique (Gentry et Cashel, 1995). Cependant, des données récentes démontrent une interaction entre SpoT et la protéine CgtA qui se lie aux ribosomes (Wout *et al.*, 2004), il se pourrait donc que SpoT se lie aux ribosomes par ce biais.

Alors que la synthèse de (p)ppGpp par RelA est induite seulement lors de carences en acides aminés, l'accumulation de (p)ppGpp par SpoT se produit suite à une grande diversité de carences : sources de carbone (Xiao *et al.*, 1991 ; Murray et Bremer, 1996), phosphate (Spira *et al.*, 1995), fer (Vinella *et al.*, 2005), azote (Irr, 1972 ; Villadsen et Michelsen, 1977) et acides gras (Seyfzadeh *et al.*, 1993). Des stress osmotiques (Harhsman et Yamazaki, 1972) et thermiques (Gallant *et al.*, 1977) déclenchent également une réponse stringente dépendante de SpoT. La protéine SpoT doit donc être capable de reconnaître une multitude de signaux, pour déclencher l'accumulation de (p)ppGpp, provoquant ainsi l'arrêt de la division cellulaire et assurant la résistance des cellules aux stress. D'autre part, elle doit être capable de détecter la fin de ces stress et de dégrader (p)ppGpp, permettant ainsi la reprise de la croissance. La protéine SpoT joue donc un rôle central lors des transitions nutritionnelles.

Contrairement à RelA, pour laquelle le signal d'induction correspond à l'accumulation d'ARNt non chargés, les signaux auxquels répond SpoT lors des différentes carences sont largement inconnus. Comme pour *relA*, aucune régulation d'expression de *spoT* n'a été mise en évidence. La régulation des activités catalytiques de SpoT ne semblent donc pas liée à un contrôle de la quantité de la protéine, mais à d'autres mécanismes. Il se pourrait que SpoT détecte la disponibilité en source de carbone via une molécule signal soluble (Gentry et Cashel, 1995), peut-être impliquée dans la biosynthèse des acides gras. En effet, une carence en acides gras stimule l'accumulation de (p)ppGpp via SpoT chez *E. coli* (Seyfzadeh *et al.*, 1993). Ce phénotype peut être obtenu en inactivant le gène codant l'acétyl-coA carboxylase, catalysant la première étape de la biosynthèse des acides gras (Li et Cronan, 1992 ; Magnuson *et al.*, 1993), ou en utilisant la cérulénine, un inhibiteur de biosynthèse des acides gras (Omura, 1981 ; Moche *et al.*, 1999). Or le précurseur de biosynthèse des acides gras, l'acétyl-coA, est principalement produit lors de la glycolyse, quand le glucose est la seule source de carbone disponible (Kumari *et al.*, 2000). Ainsi une carence en glucose

pourrait également causer l'inhibition de synthèse d'acides gras (DiRusso et Nyström, 1998). Selon un modèle proposé par DiRusso et Nyström, il est alors possible que SpoT détecte un signal généré pendant le métabolisme des acides gras permettant de mesurer la disponibilité en source de carbone (DiRusso et Nyström, 1998).

Selon un autre modèle (Murray et bremer, 1996), la protéine SpoT répondrait à la concentration intracellulaire en ARNt non chargés de la même façon que RelA. En effet, ceux-ci inhibent la dégradation de (p)ppGpp par SpoT *in vitro* (Richter, 1980). Dans ce cas, la détection du ratio ARNt chargés / ARNt non chargés lors de carences provoquerait simultanément l'induction de la synthèse de (p)ppGpp par RelA et l'inhibition de sa dégradation par SpoT. Ceci entraînerait ainsi une accumulation rapide et importante de (p)ppGpp, permettant une réponse cellulaire presque instantanée aux carences.

Une carence en fer provoque une accumulation de (p)ppGpp dépendante de SpoT (Vinella *et al.*, 2005). En retour, (p)ppGpp exerce un contrôle positif sur la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer, limitant ainsi la carence (Vinella *et al.*, 2005). Un rôle du fer dans la régulation des deux activités catalytiques de SpoT a été suggéré. En effet, une carence en fer inhibe la maturation de certains ARNt (Björk, 1996). Cela pourrait aboutir à une diminution du rapport ARNt chargés / ARNt non chargés, ce qui pourrait entraîner l'accumulation de (p)ppGpp par SpoT par l'activation de son activité de synthèse et l'inhibition de son activité de dégradation (Vinella *et al.*, 2005). Le fer pourrait donc représenter un signal métabolique déclenchant la réponse stringente via SpoT.

### III.2.3.2. Caractérisation fonctionnelle de SpoT

Afin de déterminer les régions de SpoT impliquées dans chacune des activités, des fragments de *spoT* clonés dans des plasmides ont été testés pour leur capacité à compléter des mutants défectifs pour chaque activité (Gentry et Cashel, 1996). Les deux activités catalytiques de SpoT sont portées par la partie N-terminale. Les 203 premiers acides aminés sont suffisants pour l'activité de dégradation de (p)ppGpp, tandis que les acides aminés 67 à 374 sont suffisants pour l'activité de synthèse dite PSII. Les deux sites catalytiques se chevauchent donc (Gentry et Cashel, 1996) (Fig.13). La protéine SpoT fait partie d'une superfamille d'enzymes à activité phosphohydrolase métal-dépendante, dont la signature est un motif HD (Yakunin *et al.*, 2004). Ce motif comporte des résidus histidine et aspartate très conservés responsables de l'activité phosphohydrolase. Le motif HD de SpoT est situé entre

les résidus 45 et 144, au niveau du domaine de dégradation et est essentiel à l'hydrolyse de (p)ppGpp (Fig.13).

Contrairement au domaine NTD, le rôle du domaine CTD n'est pas connu. L'étude d'homologues bifonctionnels Rel/Spo, présentés dans la partie III.2.4, suggère que ce domaine intervient dans la régulation des deux activités catalytiques de SpoT. Un domaine appelé TGS (car trouvé dans les protéines ThrRS, GTPases et SpoT) (Wolf *et al.*, 1999), localisé entre les résidus 384 et 447, sépare les domaines NTD et CTD. Il n'existe pas d'information directe quant à son rôle, mais sa présence dans deux types de protéines régulatrices liant des nucléotides (plusieurs GTPases et SpoT) suggère un rôle régulateur via la liaison d'un nucléotide (Czyz et Wegrzyn, 2005).

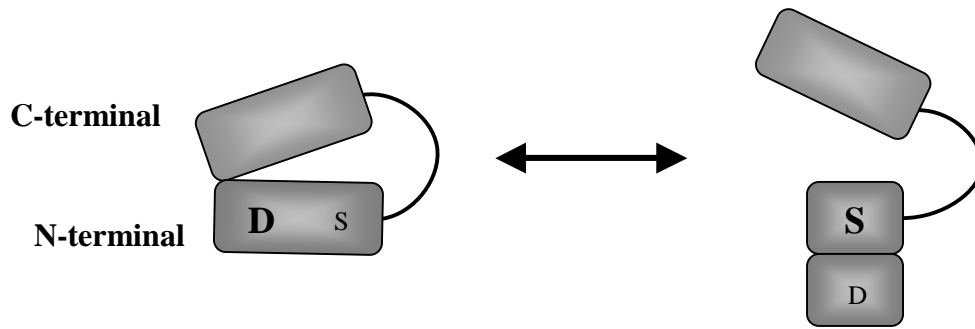
### III.2.3.3. Interactions protéiques impliquant SpoT

Récemment, la cartographie systématique des interactions protéiques pouvant exister chez *E. coli* a été entreprise par une technique de purification par affinité en tandem (TAP-tag) (Butland *et al.*, 2005). Des interactions entre SpoT et un certain nombre d'autres protéines ont été suggérées. Hormis les protéines ribosomiques, si abondantes dans la cellule qu'elles peuvent donner lieu à des interactions non spécifiques, SpoT pourrait interagir avec des hélicases de l'ARN codées par *srmB*, *hrpA* et *deaD* (Nishi *et al.*, 1988 ; Moriya *et al.*, 1995 ; Toone *et al.*, 1991). Elle interagirait également avec SpoU, une ARN méthyltransférase putative, codée par un gène appartenant au même opéron que *spoT* (Koonin et Rudd, 1993). La protéine SpoT semble aussi interagir avec le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu, codé par les gènes *tufA* et *tufB* (Van der Meide *et al.*, 1982), la sous-unité alpha de la protéine du nucléoïde HU, codée par *hupA* (Kano *et al.*, 1988), une NAD kinase putative codée par *yffB*, la protéine MukB impliquée dans la partition des chromosomes (Niki *et al.*, 1991) et la protéine ACP (acyl carrier protein) transporteur de groupements acyles, codée par *acpP* (Majerus *et al.*, 1964). Cette dernière interaction a été détectée de façon indépendante par une autre équipe utilisant la même technique (Gully *et al.*, 2003). Elle pourrait constituer un lien intéressant entre le métabolisme des lipides et la réponse stringente. La protéine SpoT interagirait également avec elle-même. Toutes ces interactions nécessitent d'être confirmées par des techniques indépendantes et pourraient révéler la nature de certains mécanismes impliqués dans l'induction de la réponse stringente via SpoT en réponse à diverses carences.

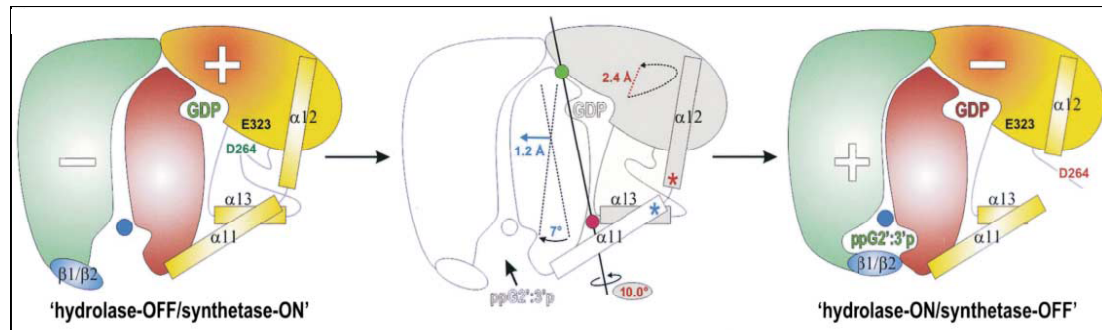
Des expériences de co-précipitation et de double hybride menées chez *E. coli* ont montré que SpoT interagirait également avec ObgE, encore appelée CgtA (Wout *et al.*, 2004). Cette protéine fait partie de la famille Obg qui comporte des protéines essentielles qui lient le GTP. Elles sont très conservées des bactéries aux eucaryotes, y compris chez les humains (Buglino *et al.*, 2002 ; Czyz et Wegrzyn, 2005). L'archétype des protéines Obg a été découvert chez *B. subtilis* pour son implication dans le contrôle de la sporulation (Trach et Hoch, 1989). Depuis, un homologue de Obg a été mis en évidence chez *Caulobacter crescentus* (CgtA : caulobacter GTP-binding protein, Maddock *et al.*, 1997), chez *S. coelicolor* (Okamoto et Ochi, 1998), *Vibrio harveyi* (Czyz *et al.*, 2001), et *E. coli* (Kobayashi *et al.*, 2001). Bien que leurs fonctions ne soient pas connues avec précision, les protéines CgtA sont essentielles à la viabilité cellulaire. Un certain nombre d'études ont révélé leur implication dans la réplication et la partition des chromosomes chez *B. subtilis* (Kok *et al.*, 1994), *C. crescentus* (Datta *et al.*, 2004) et *E. coli* (Kobayashi *et al.*, 2001 ; Dutkiewicz *et al.*, 2002), ainsi que dans la réparation de l'ADN chez *E. coli* et *V. harveyi* (Zielke *et al.*, 2003). Un rôle de CgtA dans la maturation et l'assemblage des ribosomes a été suggéré, de par son interaction avec la sous-unité ribosomique 50S chez *C. crescentus* (Lin *et al.*, 2004, Datta *et al.*, 2004), *E. coli* (Wout *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2005) et *B. subtilis* (Scott *et al.*, 2000 ; Zhang et Haldenwang, 2004). L'implication de CgtA dans ces différents processus serait due à sa capacité à répondre à une variation du rapport GTP/GDP (Kok *et al.*, 1994 ; Maddock *et al.*, 1997). Grâce à son interaction avec SpoT, la protéine CgtA pourrait constituer un lien important entre la réponse stringente et des processus essentiels à la viabilité cellulaire. De plus, la résolution de la structure 3D de CgtA a révélé une poche de liaison au GTP occupée par ppGpp (Buglino *et al.*, 2002). Enfin, il faut noter que le domaine C-terminal de CgtA est structurellement similaire au domaine TGS de SpoT.

### III.2.4. Les homologues Rel/Spo

Chez la plupart des bactéries, le métabolisme de (p)ppGpp est sous le contrôle de protéines uniques, contrairement à *E. coli* qui possède deux protéines RelA et SpoT (Braeken *et al.*, 2006). Ces protéines ont été appelées Rel, suivi d'une abréviation de l'espèce concernée : par exemple la réponse stringente est contrôlée par la protéine Rel<sub>seq</sub> chez *S. equisimilis* (Braeken *et al.*, 2006) (Fig.13). Ces protéines uniques pourraient être codées par un gène ancestral (Mittenhuber, 2001), *relA* et *spoT* résultant alors d'une duplication de ce gène. Chez les plantes, la synthèse et la dégradation de (p)ppGpp sont également contrôlées



**Figure 14 : Modèle de régulation réciproque des activités catalytiques de Rel<sub>seq</sub> par interaction des domaines N- et C-terminal (d'après Mechold *et al.*, 2002).** Les activités catalytiques de synthèse (S) et de dégradation (D) de (p)ppGpp sont portées par le domaine N-terminal, lié au domaine régulateur C-terminal via une région flexible accessible aux protéases. L'interaction entre les deux domaines activerait l'activité de dégradation et réprimerait l'activité de synthèse de Rel<sub>seq</sub>. Lorsque les deux domaines n'interagissent pas, le domaine N-terminal aurait une tendance à se replier, activant ainsi la synthèse et réprimant la dégradation de (p)ppGpp.



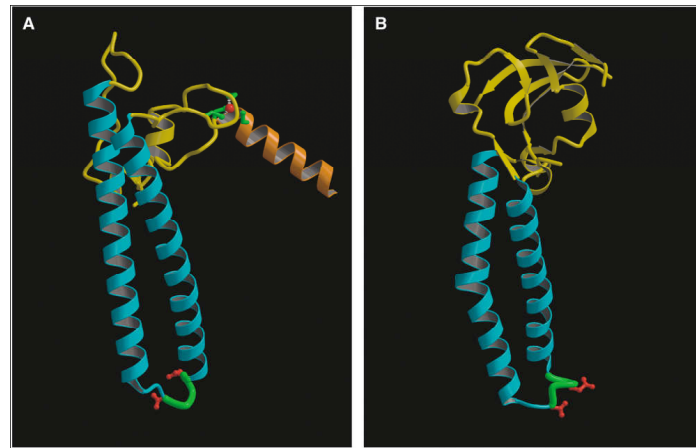
**Figure 15 : Transmission du signal du site hydrolytique au site de synthèse de (p)ppGpp dans le domaine N-terminal de Rel<sub>seq</sub> (aa 1-385) (d'après Hogg *et al.*, 2004).** L'unité cristallographique asymétrique contient deux copies de Rel<sub>seq</sub> 1-385 schématisées à droite et à gauche. Deux domaines catalytiques sont clairement évidents dans chaque monomère avec les domaines hydrolase (résidus 5-159 en bleu) et synthétase (176-371 en jaune) joints par un domaine chevauchant fait de 3 hélices (résidus 135-195 en rouge). L'illustration centrale représente les mouvements du domaine N-terminal suite à la liaison du ligand au niveau du site d'hydrolyse conduisant à une conformation hydrolase ON/synthetase OFF (ici ppG2':3'p a été co-cristallisé avec l'enzyme, on estime que la même situation se produit avec ppGpp).



par des protéines uniques appelées RSH pour « Rel/Spo Homolog » (Fig.13), mais codées par des gènes présents en multiples copies dans le génome (Van der Biezen *et al.*, 2000 ; Givens *et al.*, 2004). Il a été suggéré que chaque copie réponde à un stress particulier (Givens *et al.*, 2004). Dans tous les cas, les gènes *rel* et *rsh* codent des protéines bifonctionnelles possédant à la fois les activités de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp, comme SpoT (Fig.13).

Une de ces protéines, Rel<sub>seq</sub> (739aa) de *S. equisimilis*, a été bien étudiée (Mechold *et al.*, 1996, Hogg *et al.*, 2004, Mechold *et al.*, 2002). Grâce à une protéolyse limitée de Rel<sub>seq</sub>, ses domaines catalytiques ont pu être cartographiés (Mechold *et al.*, 2002). Les domaines N et C-terminal (NTD et CTD) semblent liés par une tige flexible, sensible à la protéolyse (Mechold *et al.*, 2002). Le domaine N-terminal comporte les activités de synthèse (aa 79 à 385) et de dégradation de (p)ppGpp (aa 1 à 224), tout comme SpoT (Fig.13). Le domaine C-terminal est impliqué dans la régulation des activités catalytiques. En effet, une délétion du domaine C-terminal active la synthèse de (p)ppGpp et inhibe sa dégradation, favorisant l'accumulation de (p)ppGpp. Alors qu'elle se comporte de la même façon que RelA dans son contexte génétique d'origine, la protéine Rel<sub>seq</sub> présente les mêmes activités que SpoT chez *E. coli* : une forte activité de dégradation et une faible activité de synthèse de (p)ppGpp (Mechold *et al.*, 1996). Ainsi, chez *E. coli*, Rel<sub>seq</sub> ne restaure pas la capacité à induire la réponse stringente, sauf lorsque l'on remplace son CTD par celui de RelA (Mechold *et al.*, 2002). Le CTD et le contexte génétique sont donc importants pour la détermination de l'activité de cette protéine. Un modèle a été proposé selon lequel les domaines NTD et CTD interagiraient, cette conformation activant la dégradation et réprimant la synthèse (Mechold *et al.*, 2002). Lorsque ce contact est altéré, le domaine NTD aurait une tendance intrinsèque à se replier, activant la synthèse et réprimant la dégradation (Fig.14). L'altération du contact NTD-CTD pourrait être due à la liaison de la protéine Rel<sub>seq</sub> aux ribosomes.

Soulignant cette hypothèse, la résolution de la structure cristallographique du NTD de Rel<sub>seq</sub> révèle deux conformations distinctes nommées « hydrolase on / synthétase off » et « hydrolase off / synthétase on » (Hogg *et al.*, 2004) (Fig.15). L'unité cristallographique asymétrique contient deux copies du NTD de Rel<sub>seq</sub> (résidus 1 à 385). Deux domaines catalytiques sont clairement évidents dans chaque monomère avec les domaines hydrolase (résidus 5-159) et synthétase (176-371) liés par un domaine chevauchant fait de 3 hélices (résidus 135-195). Les sites actifs contiennent des nucléotides liés, notamment un nucléotide cyclique inhabituel lié au site d'hydrolyse (ppG2' :3'p), qui semble bloquer la protéine dans une conformation « hydrolase on / synthétase off ». La régulation réciproque des deux



**Figure 16 : Structures de DksA (A) et de GreA (B) (d'après Perederina *et al.*, 2004).** Les deux protéines comportent un domaine coiled-coil (en bleu) situé au niveau du canal secondaire de l'ARN polymérase et un domaine globulaire (en jaune) impliqué dans une interaction avec l'ARN polymérase. Le lien entre les deux hélices du domaine coiled-coil est représenté en vert. Les résidus acides conservés au bout des domaines coiled-coil sont représentés en rouge. Dans DksA, un ion zinc (sphère rouge) est coordonné par quatre résidus cystéine (en vert). La protéine DksA comporte également une hélice C-terminale (en orange).

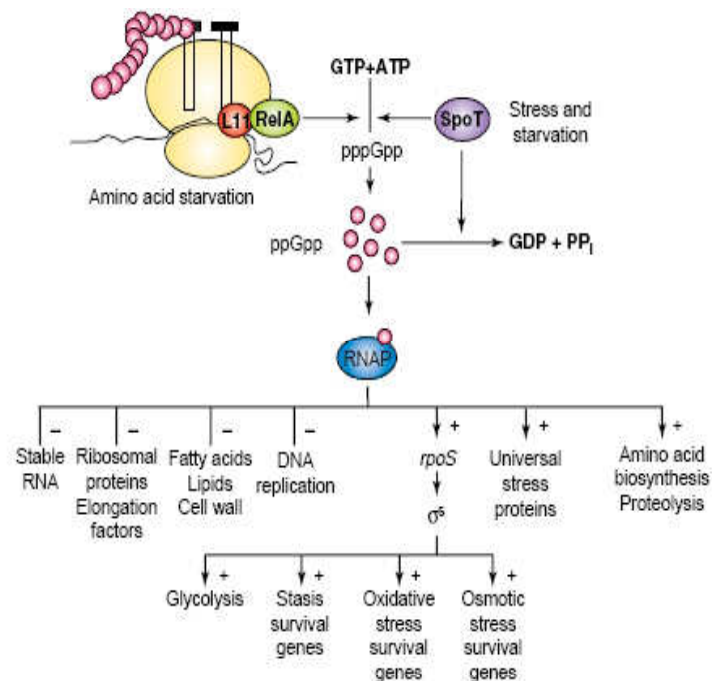
activités pourrait impliquer une transmission de signal induite par le ligand entre les deux sites actifs (Hogg *et al.*, 2004) (Fig.15).

### III.2.5. DksA

Depuis que (p)ppGpp a été reconnu comme effecteur du contrôle stringent (Cashel et Gallant, 1969 ; Gallant et Cashel, 1967), ses effets sur l'expression des gènes ont été très étudiés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Cependant, les effets de (p)ppGpp observés *in vitro* sont différents de ceux observés *in vivo*. En effet, l'activation des gènes de biosynthèse d'acides aminés par (p)ppGpp n'est détectée qu'*in vivo* (Choy, 2000), ce qui pourrait s'expliquer par la nécessité pour (p)ppGpp d'agir avec un ou plusieurs autre(s) facteur(s), absent(s) *in vitro*. Plusieurs observations suggèrent que la protéine DksA (DnaK suppressor A) pourrait représenter un bon candidat (Kang et Craig, 1990). D'une part, une mutation *dksA* a des effets pleiotropes, similaires à ceux observés chez une souche dépourvue de (p)ppGpp. Un mutant  $\Delta dksA$  est en effet auxotrophe pour plusieurs acides aminés (Kang et Craig, 1990 ; Webb *et al.*, 1999), ce phénotype étant supprimé par des mutations dans *rpoB*, codant la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase, de la même façon que chez un mutant (p)ppGpp<sup>0</sup> (Brown *et al.*, 2002) (voir section III.3.1). De plus, les effets d'une délétion *dksA* sur l'induction de *rpoS* sont similaires à ceux d'une double délétion *relA spoT* (Hirsch et Elliott, 2002).

L'effet de (p)ppGpp sur la transcription de ses gènes cibles a donc été testé *in vitro* en présence de DksA (Paul *et al.*, 2004, 2005). La protéine DksA amplifie d'une part l'inhibition de la transcription des ARNr induite par (p)ppGpp (Paul *et al.*, 2004) et d'autre part la stimulation de la transcription à partir de promoteurs d'acides aminés (Paul *et al.*, 2005). La protéine DksA et (p)ppGpp semblent donc agir en synergie pour contrôler la transcription des gènes cibles de (p)ppGpp (Perederina *et al.*, 2004 ; Paul *et al.*, 2004).

Le mécanisme d'action de DksA n'est pas déterminé par sa concentration qui semble rester constante au cours du cycle cellulaire (Paul *et al.*, 2004), mais il a été suggéré suite à la détermination de sa structure. Il s'agit d'un facteur de transcription homologue du point de vue structural aux facteurs de clivage de l'ARN GreA et GreB (Fig.16), qui sont associés à l'ARN polymérase. La protéine DksA (17 Kda) est formée de trois domaines : un module globulaire formé par les extrémités N-terminale et C-terminale, un domaine coiled coil central de 75 aa formé de 2 hélices alpha et un motif à doigt de zinc (Fig.16). Elle est également caractérisée par deux résidus aspartate très conservés en positions 71 et 74 (Perederina *et al.*, 2004) (Fig.16). Comme GreA et GreB, elle est capable de se fixer au



**Figure 17 : Effets de (p)ppGpp sur l'expression globale des gènes (d'après Magnusson *et al.*, 2005).** Le nucléotide pppGpp est produit via RelA et SpoT en réponse à différentes conditions de stress puis converti en ppGpp. Celui-ci se lie à l'ARN polymérase et réoriente la transcription vers des gènes nécessaires à la résistance aux stress et la survie en période de carences.

niveau du canal secondaire de l'ARN polymérase. De cette façon, il est possible qu'elle stabilise la fixation de (p)ppGpp à l'ARN polymérase (Perederina *et al.*, 2004). Ce mécanisme est détaillé dans la section III.3.4.2.

### III.3. (p)ppGpp et la régulation de l'expression des gènes

L'analyse de l'expression des gènes chez des souches synthétisant ou non (p)ppGpp en période de carences montre que (p)ppGpp a des effets très pleiotropes, directs ou indirects (Tableau 1) (Furano et Wittel, 1977 ; Ikemura et Dahlberg, 1973 ; Kingston *et al.*, 1981 ; Reeh *et al.*, 1976 ; Jones *et al.*, 1992 ; Schreiber *et al.*, 1991). L'accumulation de (p)ppGpp permet d'inhiber l'expression de gènes nécessaires à la croissance et d'activer l'expression de gènes indispensables à la survie. La première caractéristique de la réponse stringente est l'inhibition de synthèse des ARN stables. Ceci conduit à une diminution du taux de synthèse protéique et à une baisse de la vitesse de croissance. L'accumulation de (p)ppGpp entraîne également une inhibition de la traduction, via l'activation du facteur de modulation des ribosomes (RMF) qui provoque la dimérisation et l'inactivation des ribosomes (Wada *et al.*, 2000 ; Izutsu *et al.*, 2001 ; Yamagishi *et al.*, 1993). Il se produit également une inhibition de la synthèse des phospholipides, des acides gras et de la réplication du chromosome impliquant un ralentissement ou un arrêt de la division cellulaire (Cashel *et al.*, 1996) (Tableau 1, Fig.17). La protéine DnaA représente la protéine majeure impliquée dans l'initiation de la réplication du chromosome (Chiaramello et Zyskind, 1989). La concentration de la protéine DnaA, directement proportionnelle au taux de croissance, détermine donc le taux de réplication du chromosome (Lobner-Olesen *et al.*, 1989). Les deux promoteurs de l'opéron contenant les gènes *dnaA*, *dnaN*, *recF*, *gyrB* sont régulés négativement par (p)ppGpp, ce qui permet de coupler la réplication de l'ADN au taux de croissance (Chiaramello et Zyskind, 1990) (Fig.17). D'autre part, la réponse stringente active la protéolyse (St John *et al.*, 1978 ; St John et Goldberg, 1978 ; Sussman et Gilvarg, 1969 ; Rafaeli-Eshkol et Hershko, 1974) et la transcription des gènes de biosynthèse et de transport d'acides aminés (Riggs *et al.*, 1986 ; Venetianer, 1969), ce qui permet de pallier à la carence (Tableau 1, Fig.17). (p)ppGpp active également la production de RpoS, facteur sigma spécifique de la phase stationnaire et de multiples stress (Gentry *et al.*, 1993), ce qui permet aux cellules de s'adapter et de résister aux déficiences nutritionnelles (Tableau 1, Fig.17).

Fonction cellulaire	Processus régulés par (p)ppGpp	Type de régulation (activation : +, répression : -)
Traduction	Transcription des opérons d'ARNr	-
	Expression des protéines ribosomiques	-
	Transcription des ARNt	-
	Expression des facteurs d'élongation EF-Tu, EF-Ts, EF-G	-
Transcription	Expression de RpoD	-
	Expression de RpoS	+
	Activité de RpoS, RpoN, RpoH	+
Métabolisme des nucléotides	Expression de l'adenylosuccinate synthétase	-
	Expression de l'IMP déshydrogénase	-
	Expression de l'aspartate transcarbamylase	-
	Expression de la thymidine phosphorylase	+
	Biosynthèse de pyrimidine	-
	Expression de l'uridine phosphorylase	+
Métabolisme des acides aminés	Biosynthèse de l'arginine	+
	Biosynthèse de la glutamine et du glutamate	+
	Biosynthèse de l'histidine	+
	Biosynthèse de l'isoleucine et de la valine	+
	Biosynthèse de la lysine	+
	Biosynthèse de la méthionine et de la thréonine	+
Protéines associées au nucléoïde	Expression de la sous-unité $\alpha$ de IHF	+
	Expression de Fis	-
Transport	Transport de l' $\alpha$ -méthyl-glucoside	-
	Expression de la guanine phosphoribosyltransférase	-
	Expression de l'adénine phosphoribosyltransférase	-
	Expression de l'uracile phosphoribosyltransférase	-
	Transport des acides aminés branchés	+
Métabolisme des carbohydrates	Expression de la $\beta$ -galactosidase	+
	Synthèse de glycogène	+
Métabolisme de l'enveloppe	Synthèse de phospholipides	-
	Synthèse de peptidoglycane	-
Réplication de l'ADN	Synthèse de DnaA	-

**Tableau 1 : Le régulon de (p)ppGpp (d'après Cashel *et al.*, 1996 et Zhou et Jin, 1998).** Ce tableau représente l'ensemble des gènes et fonctions régulés par (p)ppGpp, ainsi que le type de régulation exercé.

Les nucléotides (p)ppGpp jouent également un rôle régulateur mal défini dans la synthèse du peptidoglycane (Tableau 1, Fig.17). L'hydrolyse et la synthèse de peptidoglycane, toutes deux requises pour l'élongation et la division cellulaire sont soumises au contrôle stringent (Ishiguro et Ramey, 1976, 1978, 1980 ; Vanderwel et Ishiguro, 1984 ; Betzner *et al.*, 1990) (Fig.17). Le peptidoglycane synthétisé dans les cellules sous contrôle stringent serait également plus résistant aux autolysines (Goodell et Tomasz, 1980 ; Tuomanen *et al.*, 1988). Cependant, aucune modification de composition n'a été détectée. La plupart des études attribuant un effet de (p)ppGpp dans la division cellulaire résultent de l'utilisation de mécillinam, un antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactamines qui se lie spécifiquement à PBP2 et l'inactive (Spratt et Pardee, 1975 ; Spratt, 1977). Une accumulation de (p)ppGpp entraîne une résistance au mécillinam et compense une délétion de *pbpA*, en principe létale (Aono *et al.*, 1979 ; Vinella *et al.*, 1993 ; Joseleau-Petit *et al.*, 1994). Une surexpression de FtsQ, FtsA ou FtsZ, protéines impliquées dans la formation du septum, confère une résistance au mécillinam (Vinella *et al.*, 1993). Or ces protéines sont sous contrôle de RpoS, lui-même activé par (p)ppGpp (Sitnikov *et al.*, 1996 ; Gentry *et al.*, 1993). Une surexpression de (p)ppGpp pourrait donc aboutir à une résistance au mécillinam par ce biais.

Enfin, il a également été démontré que (p)ppGpp régulait l'expression d'autres régulateurs globaux tels que CRP et Fis, ce qui le place au sommet des réseaux de régulation (Traxler *et al.*, 2006 ; Ninnemann *et al.*, 1992).

A l'entrée en phase stationnaire, l'étude protéomique d'une souche dépourvue de (p)ppGpp révèle qu'elle semble se comporter comme si elle était « bloquée » en phase exponentielle (Magnusson *et al.*, 2003). Dans une souche sauvage, la transition entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire se caractérise majoritairement par la diminution de l'expression des protéines ribosomiques. Dans une souche (p)ppGpp<sup>0</sup>, l'expression de ces protéines n'est au contraire pas modifiée. L'expression globale des gènes fluctue peu lors de la transition phase exponentielle – phase stationnaire dans une souche (p)ppGpp<sup>0</sup>. La synthèse de (p)ppGpp représente donc un point de contrôle majeur de l'entrée en phase stationnaire. De plus, la dégradation de (p)ppGpp est un prérequis de la reprise de croissance. Il s'agit donc d'un régulateur crucial de la réponse cellulaire aux transitions croissance – carence et carence – croissance.

Afin d'analyser le mécanisme d'action de (p)ppGpp, des analyses génétiques ont été entreprises en utilisant les propriétés de mutants dépourvus de (p)ppGpp ((p)ppGpp<sup>0</sup>).

### III.3.1. Etude des mutants dépourvus de (p)ppGpp

Les souches dépourvues de (p)ppGpp sont auxotrophes pour 9 acides aminés (Arg, Gly, His, Leu, Met, Phe, Ser, Thr, Val) (Xiao *et al.*, 1991) et leur survie est altérée en phase stationnaire (Cashel *et al.*, 1996). Des mutants suppresseurs spontanés du phénotype de polyauxotrophie ont été sélectionnés sur milieu minimum. La totalité des mutations suppresseurs a été cartographiée dans les gènes codant les sous-unités de l'ARN polymérase. La majorité d'entre elles (plus de 90%) touchent les gènes *rpoB* et *rpoC*, codant respectivement les sous-unités catalytiques  $\beta$  et  $\beta'$  de l'ARN polymérase (Cashel *et al.*, 1996 ; Zhou et Jin, 1998). Les autres mutations affectent le gène *rpoD*, codant la sous-unité  $\sigma^{70}$  de l'ARN polymérase et altèrent la région 3 de  $\sigma^{70}$ , impliquée dans la liaison à l'ARN polymérase (Hernandez et Cashel, 1995 ; Lesley et Burgess, 1989). Tous ces mutants semblent mimer les effets de (p)ppGpp en absence de ce dernier. Ils sont en effet capables d'inhiber la synthèse des ARN stables et d'activer la production de RpoS en absence de (p)ppGpp (Zhou et Jin, 1998 ; Hernandez et Cashel, 1995). Les ARN polymérases qui résultent de ces mutations sont qualifiées de stringentes. Tous ces résultats suggèrent que l'ARN polymérase pourrait constituer une cible d'action de (p)ppGpp.

### III.3.2. Le contrôle stringent négatif

L'étude des mutations *rpoB* et *rpoC* restaurant la prototrophie des souches (p)ppGpp<sup>0</sup> a permis de déterminer le mécanisme d'action moléculaire de (p)ppGpp (Little *et al.*, 1983 ; Bartlett *et al.*, 1998 ; Zhou et Jin, 1998). L'interaction d'ARN polymérases sauvages ou stringentes avec différents promoteurs régulés négativement par (p)ppGpp (*pyrBI* P, *rrnB* P1, *rpoD* P1 et P2) a été étudiée *in vitro* (Zhou et Jin, 1998). Tous les promoteurs stringents testés révèlent une interaction avec l'ARN polymérase sauvage intrinsèquement instable (Zhou et Jin, 1998). Cette interaction est d'autant plus déstabilisée en présence d'ARN polymérases stringentes. Ceci suggère fortement que (p)ppGpp serait responsable de la déstabilisation des complexes d'initiation de la transcription (Gourse *et al.*, 1998 ; Barker *et al.*, 2001a et b). L'instabilité des complexes d'initiation de la transcription serait corrélée à la présence d'une séquence riche en GC appelée discriminateur et située entre la boîte -10 et le +1 de transcription (Zacharias *et al.*, 1989 ; Figueroa-Bossi *et al.*, 1998). Cette séquence représente une barrière énergétique qui inhibe l'étape d'isomérisation des complexes fermés d'initiation de la transcription en complexes ouverts (Zhou et Jin, 1998 ; Pemberton *et al.*,



2000 ; Auner *et al.*, 2003). Une augmentation locale de superhélicité favoriserait la formation de complexes ouverts en surmontant cette barrière énergétique, permettant ainsi d'augmenter la transcription (Zhou et Jin, 1998 ; Schneider *et al.*, 2000b ; Travers et Muskhelishvili, 2005). La topologie de l'ADN participerait donc ainsi à l'activation des promoteurs régulés négativement par (p)ppGpp (voir section IV.4). Malgré une faible demi-vie des complexes ouverts de transcription, les promoteurs inhibés par la réponse stringente sont également caractérisés par une forte affinité pour l'ARN polymérase et sont donc très actifs en phase de croissance exponentielle, lorsque le niveau de (p)ppGpp est basal. Lors de carences, l'accumulation de (p)ppGpp entraînerait la déstabilisation des complexes d'initiation de la transcription au niveau de ces promoteurs, en particulier les promoteurs d'ARN stables. Ceci résulterait en la libération d'une grande quantité de molécules d'ARN polymérases, alors disponibles pour activer d'autres promoteurs, par exemple ceux régulés positivement par la réponse stringente (Zhou et Jin, 1998). Selon cette hypothèse, le contrôle des promoteurs régulés négativement résulterait d'une action directe de (p)ppGpp, alors que ceux régulés positivement le seraient indirectement.

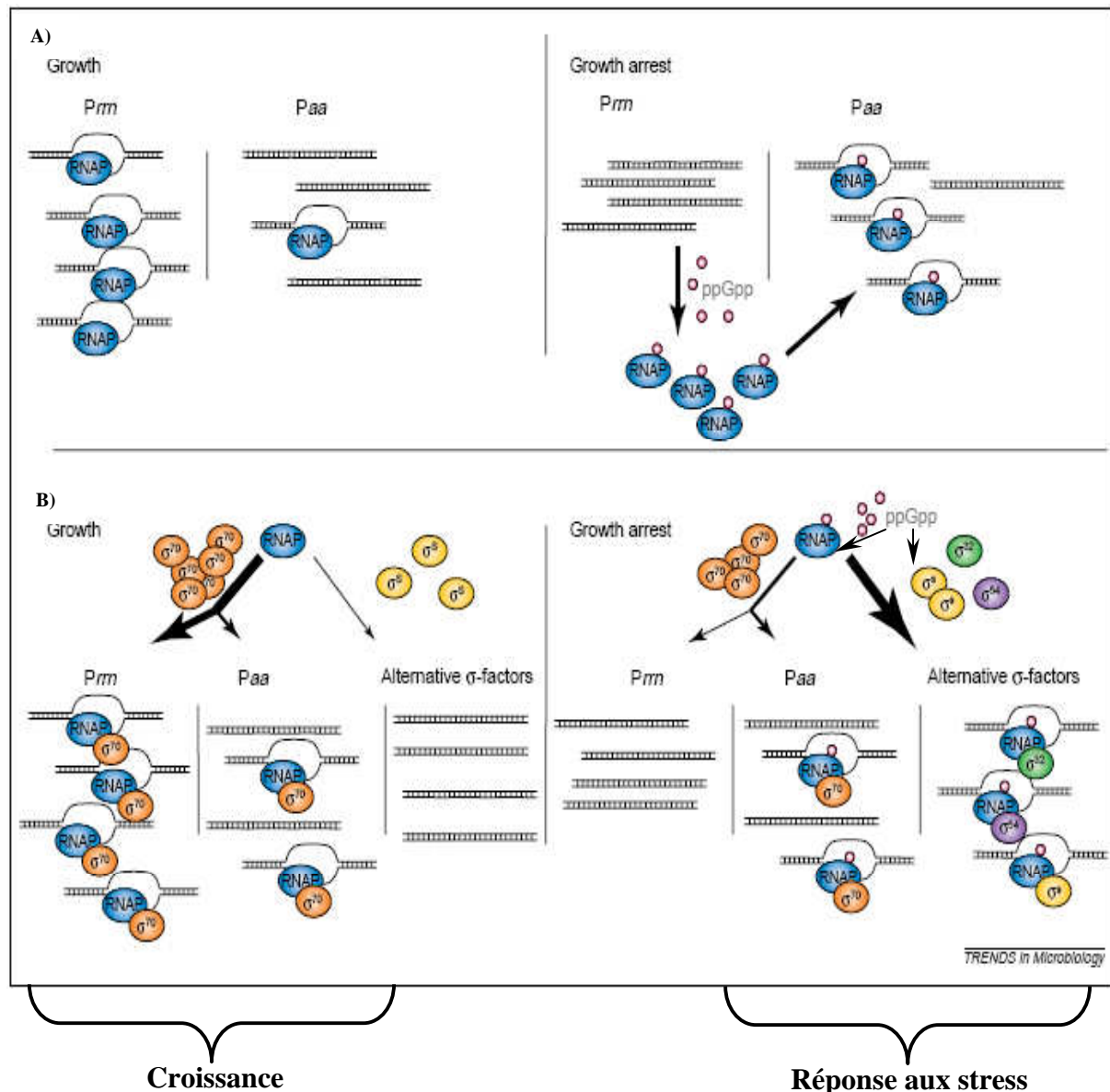
Depuis ces travaux, il a été montré que l'action déstabilisante de (p)ppGpp sur les complexes ouverts d'initiation de la transcription concernait tous les promoteurs, qu'ils soient régulés positivement ou négativement par (p)ppGpp (Barker *et al.*, 2001a et b). L'action négative de (p)ppGpp observée uniquement sur les promoteurs stringents (ex : promoteurs d'opérons d'ARN stables) est due aux propriétés de ces derniers :

- une faible demi-vie intrinsèque des complexes ouverts d'initiation de la transcription (de l'ordre de 10min, par rapport à quelques heures pour les promoteurs des gènes de biosynthèse d'acides aminés)
- la présence du discriminateur qui implique une superhélicité élevée pour la transcription des gènes régulés négativement par (p)ppGpp.

### **III.3.3. Le contrôle stringente positif**

#### **III.3.3.1. Activation de la transcription par (p)ppGpp : le modèle passif**

En 1968, Venetianer a remarqué que l'ARNm de l'opéron histidine était plus abondant pendant la réponse stringente. D'autres opérons de biosynthèse d'acides aminés sont également activés par (p)ppGpp, ce qui pourrait expliquer qu'une souche dépourvue de (p)ppGpp soit polyauxotrophe (Cashel *et al.*, 1996). Le premier modèle proposé d'activation



**Figure 18 : Régulation de la transcription globale par ppGpp (d'après Magnusson *et al.*, 2005).** A) **Modèle passif d'activation des gènes par ppGpp.** Lors de carences, l'augmentation de ppGpp déstabilise les complexes ouverts au niveau des promoteurs d'ARNr ayant une demi-vie déjà très courte. Le taux d'ARN polymérase libre liée à  $\sigma^{70}$  augmente et permet de transcrire les gènes ayant des difficultés à recruter l'ARN polymérase, comme les gènes de biosynthèse et de transport d'acides aminés. B) **Modèle actif d'activation des gènes par ppGpp.** Le nucléotide ppGpp favorise la liaison des facteurs  $\sigma$  alternatifs à l'ARN polymérase. Celle-ci est alors redirigée vers les gènes permettant de résister aux stress.

de l'expression des gènes par (p)ppGpp est un modèle passif basé sur la disponibilité des molécules d'ARN polymérase (Zhou et Jin, 1998) (Fig.18A). En phase de croissance exponentielle, 60% des molécules d'ARN polymérase sont engagées dans la transcription des ARN stables. En effet, la faible demi-vie des complexes d'initiation de la transcription au niveau de ces promoteurs est fortement contre-balançée par leur affinité élevée pour l'ARN polymérase. Les promoteurs d'opérons de biosynthèse d'acides aminés, bien que présentant une demi-vie plus élevée des complexes d'initiation de la transcription, ont une faible affinité pour l'ARN polymérase dont la concentration disponible est limitante en conditions de croissance. Pendant la réponse stringente, les complexes engagés au niveau de tous ces promoteurs seraient déstabilisés par (p)ppGpp. Cet effet est donc drastique pour les promoteurs soumis au contrôle stringent, tels que les promoteurs d'opérons d'ARN stables, ce qui libère une grande quantité d'ARN polymérase. Elles seraient alors disponibles pour la transcription à partir d'autres promoteurs, notamment ceux des opérons de biosynthèse des acides aminés, dont l'étape limitante est le recrutement de l'ARN polymérase (Ryals et Bremer, 1982 ; Zhou et Jin, 1998 ; Barker *et al.*, 2001a et b) (Fig.18A).

### III.3.3.2. Activation de la transcription par (p)ppGpp : modèle actif

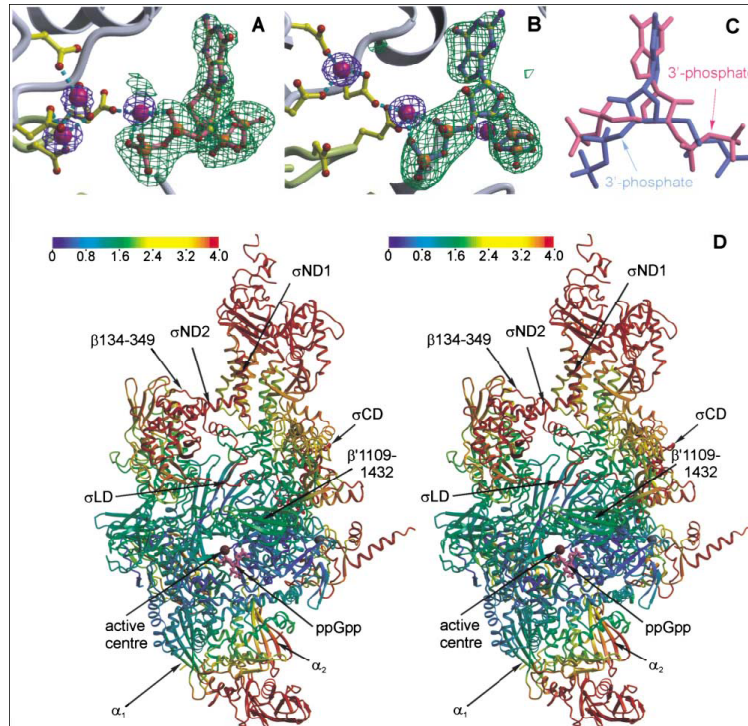
Des expériences de transcription *in vitro* couplées à la traduction dans un système contenant simultanément un promoteur activé et un promoteur inhibé par (p)ppGpp vont à l'encontre du modèle passif (Choy, 2000). En effet, l'activation du promoteur de l'opéron *his* par (p)ppGpp ne dépend pas de la disponibilité de l'ARN polymérase. D'autre part, des mutations de ce promoteur prouvent que sa structure est importante pour la régulation par (p)ppGpp (Riggs *et al.*, 1986). La présence d'un discriminateur riche en AT est notamment un élément important dans la régulation positive par (p)ppGpp (Travers, 1980, 1984). La transcription de l'opéron *arg* et du promoteur *λpaQ* est également activée de façon directe *in vitro* par (p)ppGpp (Zidwick *et al.*, 1984 ; Potrykus *et al.*, 2004). (p)ppGpp pourrait donc réguler positivement l'expression de certains gènes de façon directe.

D'autre part, le modèle passif d'activation de la transcription par (p)ppGpp a été proposé et démontré pour des promoteurs transcrits par l'holoenzyme associée à  $\sigma^{70}$ . Cependant, (p)ppGpp est nécessaire à la transcription de gènes par l'holoenzyme associée à des facteurs  $\sigma$  alternatifs tels que RpoS. Le modèle passif est donc difficilement envisageable pour l'ensemble de ces gènes.

L'étude du gène *rpoS*, codant le facteur sigma alternatif  $\sigma^S$ , dont la synthèse est dépendante de (p)ppGpp, a démontré l'existence d'un mécanisme différent du modèle passif d'activation de la transcription par (p)ppGpp. En effet, la complémentation d'une souche (p)ppGpp<sup>0</sup>, dans laquelle la synthèse de la protéine RpoS est fortement réduite (Lange *et al.*, 1995 ; Gentry *et al.*, 1993), par surexpression du gène *rpoS* ne restaure pas l'induction des gènes cibles de RpoS (Kvint *et al.*, 2000). (p)ppGpp est donc également indispensable à l'activité de RpoS. De plus, il est possible de mimer une réponse stringente dans une souche (p)ppGpp<sup>0</sup> en réduisant la quantité du facteur sigma végétatif  $\sigma^{70}$  (Magnusson *et al.*, 2003 ; Jishage *et al.*, 2002). Par ailleurs, certaines mutations affectant *rpoD*, codant  $\sigma^{70}$ , et restaurant une réponse normale aux stress en absence de (p)ppGpp avaient déjà été mises en évidence lors de la recherche de suppresseurs d'auxotrophie chez une souche dépourvue de (p)ppGpp (voir section III.3.1) (Hernandez et Cashel, 1995). Ces mutations provoquent une diminution de l'affinité de  $\sigma^{70}$  pour l'ARN polymérase cœur et favoriseraient ainsi l'association de facteurs sigmas alternatifs (Hernandez et Cashel, 1995 ; Laurie *et al.*, 2003). Il est donc envisageable que (p)ppGpp agisse en diminuant la fraction de  $\sigma^{70}$  liée à l'enzyme cœur, ce qui favoriserait l'activité de fixation des facteurs sigmas alternatifs à l'ARN polymérase cœur, dont la concentration est limitante.

Cette hypothèse a été confirmée par des expériences de compétition de facteurs sigmas pour la fixation à l'ARN polymérase cœur *in vitro*. Il a en effet été démontré que l'addition de (p)ppGpp diminue la compétitivité du facteur  $\sigma^{70}$  pour la liaison à l'enzyme cœur par rapport aux facteurs sigmas alternatifs  $\sigma^N$ ,  $\sigma^S$  et  $\sigma^H$  (Jishage *et al.*, 2002 ; Laurie *et al.*, 2003). De la même façon, en absence de (p)ppGpp, les facteurs sigmas alternatifs  $\sigma^N$ ,  $\sigma^H$  et  $\sigma^S$  sont moins compétitifs que  $\sigma^{70}$  *in vivo*, et la fraction d'enzyme cœur associée aux facteurs sigmas alternatifs est très réduite (Jishage *et al.*, 2002 ; Laurie *et al.*, 2003) (Fig.18B).

En résumé, dans des conditions favorables à la croissance, le niveau de (p)ppGpp est faible et l'ARN polymérase est préférentiellement associée au facteur  $\sigma^{70}$ , ce qui permet une transcription active des gènes stringents. Lorsque l'environnement devient défavorable, notamment lors de carences nutritionnelles, le niveau de (p)ppGpp augmente (Cashel *et al.*, 1996), ce qui entraîne une diminution de la demi-vie des complexes ouverts de la transcription. Ceci est particulièrement drastique au niveau des promoteurs stringents, dont les complexes d'initiation de la transcription sont intrinsèquement instables, et qui sont fortement transcrits en phase de croissance. Ceci provoque la libération d'une grande quantité de molécules d'ARN polymérases (Zhou et Jin, 1998 ; Barker *et al.*, 2001a et b). Celles-ci



**Figure 19 : Modèle cristallographique de l'association de ppGpp selon deux orientations distinctes au canal secondaire de l'ARN polymérase (d'après Artsimovitch *et al.*, 2004). A, B, C) Association de ppGpp avec les sous-unités  $\beta$  (vert) et  $\beta'$  (gris) de l'ARN polymérase. Les chaînes latérales des résidus aspartate du site actif sont en jaune, les sphères magenta représentent des ions  $Mg^{2+}$ . A) ppGpp est lié en orientation 5'(rose). B) ppGpp est lié en orientation 3' (bleu). C) Superposition des deux orientations. D) Schéma de l'holoenzyme liée à ppGpp dans chaque orientation.**

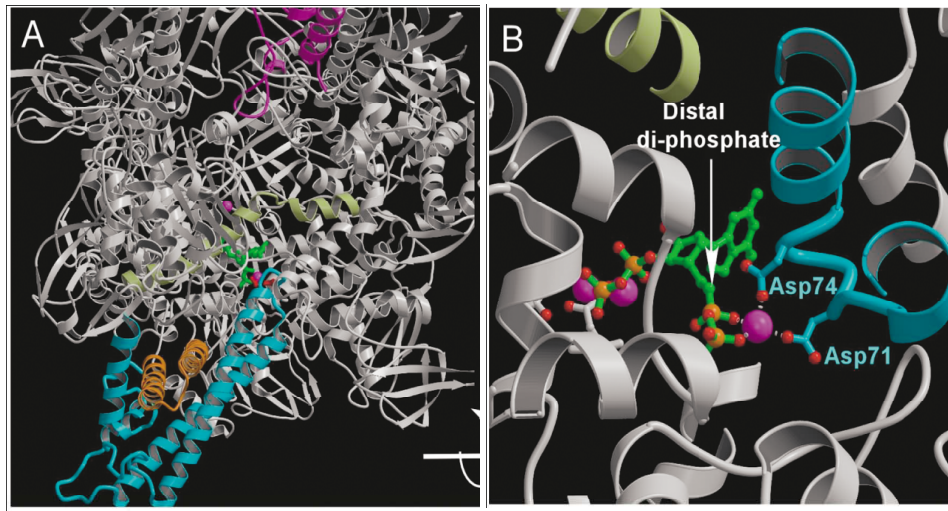
seraient alors disponibles pour activer des promoteurs possédant une plus faible affinité pour l'ARN polymérase, tels que les promoteurs des gènes de biosynthèse d'acides aminés (Barker *et al.*, 2001a et b). D'autre part, (p)ppGpp exercerait un rôle positif direct sur l'expression des gènes appartenant aux régulons des facteurs sigmas alternatifs en favorisant leur fixation à l'ARN polymérase cœur (Jishage *et al.*, 2002 ; Laurie *et al.*, 2003). Ceci permettrait de réorienter l'ARN polymérase vers des gènes de réponse aux stress. (p)ppGpp n'entraînerait cependant pas un remplacement complet de  $\sigma^{70}$  par les sigmas alternatifs, permettant ainsi d'activer les gènes dépendants de  $\sigma^{70}$ , tels que les gènes de biosynthèse d'acides aminés par le mécanisme passif (Jishage *et al.*, 2002) (Fig.18). Lors de carences, l'élévation du niveau de (p)ppGpp permettrait donc de réorganiser la transcription globale, en adaptant la composition de l'ARN polymérase aux conditions de la croissance.

### **III.3.4. Mécanisme d'action de (p)ppGpp : interaction avec l'ARN polymérase**

#### **III.3.4.1. Liaison de (p)ppGpp à l'ARN polymérase**

Une interaction directe entre (p)ppGpp et l'ARN polymérase a été mise en évidence, (p)ppGpp se liant via ses groupements diphosphates à l'interface des sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  près du site actif, dans le canal secondaire (Chatterji *et al.*, 1998 ; Reddy *et al.*, 1995 ; Touloukhonov *et al.*, 2001 ; Artsimovitch *et al.*, 2004) (Figs.19 et 20). Ce canal est formé par les domaines F et G de la sous-unité  $\beta'$ , et constitue la voie d'entrée des NTPs d'initiation de la transcription (NTPi).

Artsimovitch *et al.* (2004) ont résolu la structure cristallographique de l'ARN polymérase complexée à ppGpp (Fig.19). Ils suggèrent que l'action majeure de ppGpp est liée à une compétition avec les substrats NTPi pour le site actif de l'ARN polymérase. Le canal secondaire de l'ARN polymérase est en effet plutôt étroit, ce qui restreint l'accès des NTPs au site actif quand ppGpp y est présent. De plus, la fixation de ppGpp pourrait entraîner un changement conformationnel de l'enzyme, inhibant la fixation des NTPi (Artsimovitch *et al.*, 2004). Ceci est crucial dans le cas des promoteurs d'ARNr qui nécessitent une forte concentration de NTPi pour l'initiation de leur transcription (Barker *et al.*, 2001a et b ; Gaal *et al.*, 1997 ; Gourse, 1988). De plus, ppGpp se fixerait à l'ARN polymérase dans deux orientations distinctes (Fig.19), pouvant entraîner un appariement de bases avec les résidus cytosine du promoteur. En orientation 3', ppGpp pourrait interagir avec l'ADN de la bulle de transcription, notamment avec le discriminateur riche en GC, entraînant un délai dans



**Figure 20 : Modèle du complexe ternaire ARN polymérase-ppGpp-DksA (d'après Perederina *et al.*, 2004).**  
**A) Vue d'ensemble du complexe.** DksA est représentée en bleu, l'ARN polymérase en gris, ppGpp en orientation 3' en vert. Le site actif et les ions Mg<sup>2+</sup> liés à ppGpp sont représentés par des sphères magenta. Le domaine coiled-coil de la sous-unité β' de l'ARN polymérase est coloré en orange, la sous-unité σ en magenta.  
**B) Vue rapprochée de la liaison de ppGpp au site catalytique coordonnée par DksA.**

l'élongation de l'ARNm par ralentissement de la translocation de l'appareil transcriptionnel. Cela pourrait également provoquer une diminution de l'initiation de la transcription par induction de la dissociation des interactions protéines/ADN qui stabilisent les complexes ouverts. Le changement de l'orientation de ppGpp de 3' en 5' pourrait prévenir l'appariement de base avec l'ADN. Ce phénomène pourrait ainsi constituer un élément essentiel du contrôle de la transcription par ppGpp, aussi bien au niveau de l'initiation que de l'élongation (Fig.19).

#### III.3.4.2. Rôle des protéines DksA et GreA

Nous avons vu précédemment que la protéine DksA amplifie l'action de (p)ppGpp (voir section III.2.5). Elle pourrait agir en synergie avec ppGpp par fixation à l'ARN polymérase près du site de liaison de ppGpp (Perederina *et al.*, 2004) (Fig.20). La protéine DksA est un homologue structural des facteurs GreA et GreB de clivage de l'ARN associés à l'ARN polymérase (Fig.16). Comme ces derniers, DksA possède un domaine globulaire impliqué dans sa liaison avec l'ARN polymérase et un domaine coiled-coil qui pénètre dans le canal secondaire de l'ARN polymérase et positionne deux résidus acides près du centre catalytique (Perederina *et al.*, 2004) (Figs.16 et 20). Lorsque ppGpp est lié à l'ARN polymérase, le diphosphate distal fait face à la sortie du canal secondaire, tandis que le diphosphate proximal fait face au site actif (Artsimovitch *et al.*, 2004). Le domaine coiled-coil de DksA coordonne un ion  $Mg^{2+}$  lié au diphosphate distal de ppGpp via deux résidus aspartate. Ceci permettrait de stabiliser l'interaction de ppGpp avec le complexe de transcription (Artsimovitch *et al.*, 2004) (Fig.20). Confirmant cette hypothèse, la liaison de DksA à l'ARN polymérase réduit la durée de vie des complexes ouverts de tous les promoteurs testés, ce qui aide à l'action de (p)ppGpp (Paul *et al.*, 2004).

Les facteurs GreA et GreB ont d'abord été décrits comme des facteurs de clivage de l'ARNm bloqué dans le complexe de transcription (Fig.16). Ils faciliteraient notamment l'échappement du promoteur en supprimant la transcription abortive (Hsu *et al.*, 1995). Potrykus *et al.* (2006) ont montré que, contrairement à DksA, GreA active la transcription de *rrnB* P1, promoteur d'un opéron d'ARN stables réprimé par (p)ppGpp. La régulation de la transcription des opérons d'ARN stables pourrait impliquer une compétition des deux types de facteurs pour le canal secondaire de l'ARN polymérase. Il est possible, que comme DksA, GreA influence la fixation de (p)ppGpp à l'ARN polymérase, probablement en la déstabilisant.



### III.4. Ubiquité de la réponse stringente

La réponse stringente, mise en évidence et étudiée chez *E. coli*, est conservée chez de nombreuses bactéries et également chez les eucaryotes supérieurs comme les plantes (Braeken *et al.*, 2006 ; Godfrey *et al.*, 2002). Ce réseau de régulation globale permet l'adaptation des bactéries à des périodes de stress et de carences, mais est aussi important pour les interactions des bactéries avec leurs hôtes eucaryotes (pathogénèse, symbiose) et pour la régulation du comportement social des bactéries.

La réponse stringente est impliquée dans les phénomènes de virulence chez de nombreuses espèces : *Mycobacterium tuberculosis* (Primm *et al.*, 2000), *Listeria monocytogenes* (Taylor *et al.*, 2002), *L. pneumophila* (Hammer et Swanson, 1999), *Brucella abortus* (Kim *et al.*, 2005), *Salmonella typhimurium* (Pizarro-Cerda et Tedin, 2004 ; Song *et al.*, 2004 ; Na *et al.*, 2005). (p)ppGpp est également impliqué dans les comportements sociaux bactériens, tels que la formation de biofilms chez *E. coli* et *L. monocytogenes* (Taylor *et al.*, 2002 ; Balzer et McLean, 2002) et le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (Van Delden *et al.*, 2001). La réponse stringente joue un rôle important dans la différenciation morphologique en période de stress chez *Myxococcus xanthus* (Harris *et al.*, 1998) et *S. coelicolor* (Chakraborty et Bibb, 1997 ; Martinez-Costa *et al.*, 1996). Enfin, (p)ppGpp intervient dans la symbiose bactérie/plante chez *Rhizobium etli* et *Sinorhizobium meliloti* (Wells et Long, 2002, 2003 ; Moris *et al.*, 2005).

Des homologues des RelA et SpoT ont été mis en évidence chez *A. thaliana* (At-RSH1) et *N. tabacum* (Nt-RSH2) (Van der Biezen *et al.*, 2000 ; Givens *et al.*, 2004) (Fig.13). La protéine Nt-RSH 2 et ses homologues contiennent des séquences de transit plastidiales (Givens *et al.*, 2004) et une grande concentration de (p)ppGpp a été mesurée dans les chloroplastes de pois (Takahashi *et al.*, 2004) (Fig.13). (p)ppGpp a des effets régulateurs similaires aux bactéries dans les chloroplastes des plantes supérieures. En effet, ceux-ci présentent une activité synthétique de (p)ppGpp associée aux ribosomes 70S (Kasai *et al.*, 2004). De plus, (p)ppGpp inhibe l'activité de l'ARN polymérase du chloroplaste *in vitro* (Takahashi *et al.*, 2004). La réponse stringente peut être activée chez les plantes par des hormones comme l'acide jasmonique ou des stress physiques (Takahashi *et al.*, 2004). Plusieurs protéines RSH par espèce de plante sont recensées, pouvant répondre à des stress distincts (Givens *et al.*, 2004).

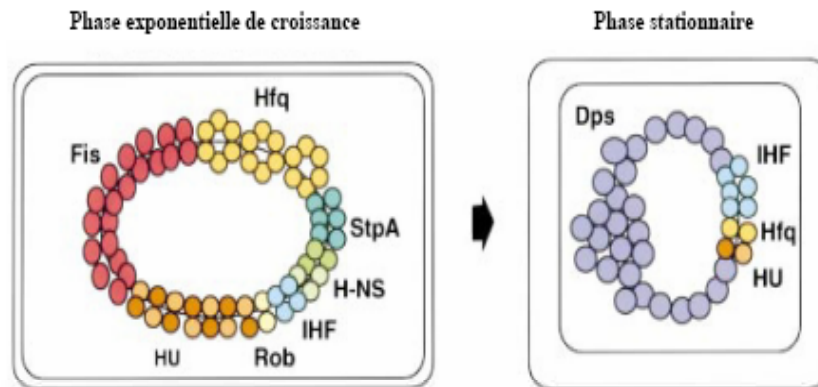
## IV. La topologie de l'ADN

---

La topologie de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation des principaux processus cellulaires, comme la réplication du chromosome, la transcription, la réparation de l'ADN ou la recombinaison. Le niveau de superhélicité négative du chromosome est modulé en fonction de l'environnement, des conditions de croissance (voir section IV.3). Ces fluctuations de topologie ont un impact important sur l'expression globale des gènes. Elles peuvent en effet affecter la transcription d'environ 7% des gènes chez *E. coli* (Peter *et al.*, 2004) (voir section IV.2). En ajustant l'expression des gènes aux conditions de croissance, la topologie de l'ADN représente un réseau de régulation globale primordial pour l'adaptation des cellules aux fluctuations de l'environnement, notamment aux transitions nutritionnelles et aux stress environnementaux.

### IV.1. Les acteurs de la topologie de l'ADN

La bactérie *E. coli* comporte un nucléoïde composé d'un chromosome circulaire extrêmement compacté. La structure et la compaction du nucléoïde sont hautement dynamiques et déterminées, en fonction des conditions de l'environnement, par l'intervention de deux types de protéines. Tout d'abord, les topoisomérases de l'ADN résolvent les problèmes topologiques liés à des processus vitaux pour la cellule (recombinaison, réplication, transcription ...), en induisant des cassures temporaires simple ou double brin dans l'ADN et des transferts de brins (Champoux, 2001). Ces enzymes contribuent ainsi à moduler et adapter le niveau de superhélicité de l'ADN. Elles régulent la topologie de façon non contrainte. D'autre part, les protéines du nucléoïde, qui sont des protéines bactériennes de type histone, modifient la superhélicité de l'ADN lors de leur liaison au chromosome (Dame, 2005). Elles exercent donc une action contrainte sur la topologie globale du chromosome. Certaines régulent également la transcription des gènes codant les topoisomérases et affectent alors la topologie globale du chromosome par ce biais. Enfin, ces protéines de type histone sont également des régulateurs de l'expression des gènes et peuvent affecter la topologie locale au niveau des promoteurs qu'elles régulent par fixation en amont de ceux-ci (McLeod et Johnson, 2001). La superhélicité du chromosome représente donc la somme de tous ces effets, contraints et non contraints.



**Figure 21 : Changements de composition et de conformation du nucléoïde en fonction de la phase de croissance d'*E. coli* W3110 (d'après Ishihama, 1999).** Fis, HU et Hfq sont les protéines majoritaires du nucléoïde lors de la phase exponentielle de croissance alors qu'en phase stationnaire Dps est prédominante. Ces changements de composition en protéines du nucléoïde sont suivis de modifications de la structure du chromosome qui jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique. En phase de croissance exponentielle, la concentration intracellulaire de Fis est de ~60 000 molécules/cellule, celle de HU est de 50 000 molécules/cellule, StpA : ~25 000 molécules/cellule, H-NS : ~22 000 molécules/cellule, IHF : ~10 000 molécules/cellule. En phase stationnaire, la concentration intracellulaire de Dps est de 120 000 molécules/cellule, celle de IHF est de 50 000 molécules/cellule (Ali Azam *et al.*, 2000 et Kajitani, 1994).

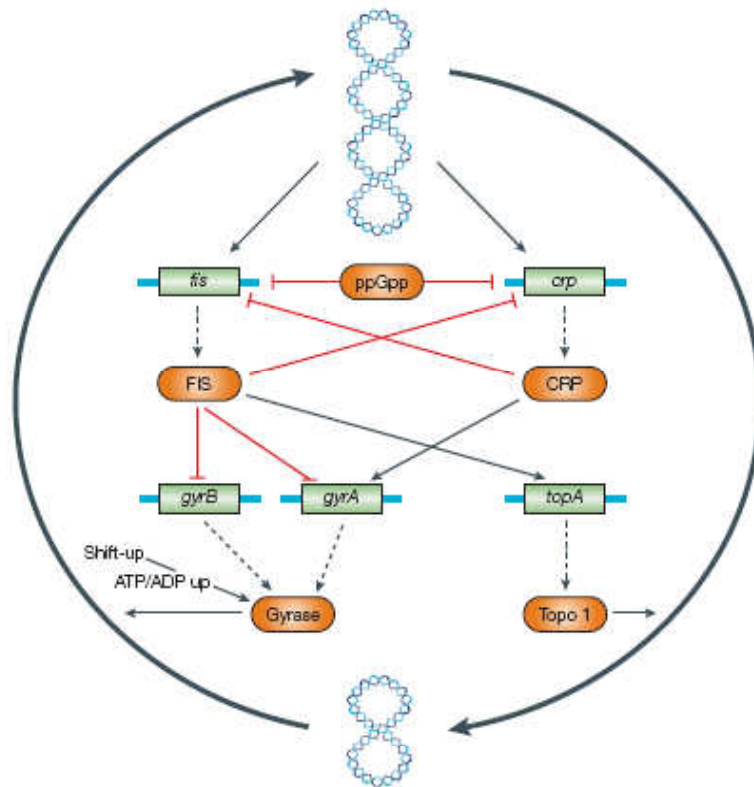
#### **IV.1.1. Les topoisomérases**

Deux classes de topoisomérases sont répertoriées : les enzymes de type I modifient la topologie par clivage d'un seul brin d'ADN, les enzymes de types II catalysent le clivage double brin de l'ADN (Champoux, 2001 ; Gellert, 1981). La bactérie *E. coli* possède quatre topoisomérases dont trois influent sur la topologie de l'ADN : la topoisomérase I (type I), la topoisomérase IV et la gyrase (type II) (Champoux, 2001). La topoisomérase I, codée par le gène *topA*, et la topoisomérase IV, composée de deux sous-unités codées par *parE* et *parC*, relâchent l'ADN, la topoisomérase IV ayant une activité mineure (Zechiedrich *et al.*, 2000). La gyrase est composée de deux sous-unités codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, et est la seule enzyme capable, en présence d'ATP, d'introduire des supertours négatifs (Reece et Maxwell, 1991). Les topoisomérases de type II sont la cible des antibiotiques de la famille des coumarines et des fluoroquinolones.

L'action combinée de ces topoisomérases permet d'ajuster la superhélicité à un niveau adéquat. En effet, une superhélicité négative trop élevée est délétère et inhibe la croissance (Drolet, 2006). D'autre part, l'initiation de la réplication du chromosome et de la transcription étant favorisées par un niveau de superhélicité négative élevé, une superhélicité négative trop faible est également néfaste pour les bactéries (Funnell *et al.*, 1987 ; Arnold et Tessman, 1988 ; Pruss et Drlica, 1989).

#### **IV.1.2. Les protéines associées au nucléoïde**

Les protéines associées au nucléoïde jouent un rôle essentiel dans l'organisation globale et la structuration du nucléoïde en exerçant une topologie contrainte sur l'ADN (Figs.9 et 21) (Grant *et al.*, 1998 ; Azam et Ishihama, 1999). Au moins 12 protéines associées au nucléoïde ont été mises en évidence chez *E. coli* (Azam et Ishihama, 1999). Cinq protéines, majoritaires dans la cellule et se liant à l'ADN de façon non spécifique, jouent un rôle majeur dans l'organisation et la compaction du nucléoïde : H-NS, HU, Fis (Factor for inversion stimulation), IHF (integration host factor) et Dps (Dame, 2005 ; Murphy et Zimmerman, 1997) (Fig.21). Le niveau d'expression de ces protéines est dépendant des conditions de croissance (Ali Azam *et al.*, 1999), ce qui permet aux cellules d'adapter le niveau de superhélicité du chromosome aux conditions environnementales (voir section IV.3.1) (Figs.9 et 21). Les protéines Fis, HU, IHF, StpA, et H-NS sont les plus abondantes en phase exponentielle de croissance (McLeod et Johnson, 2001 ; Azam *et al.*, 1999) (Fig.9 et

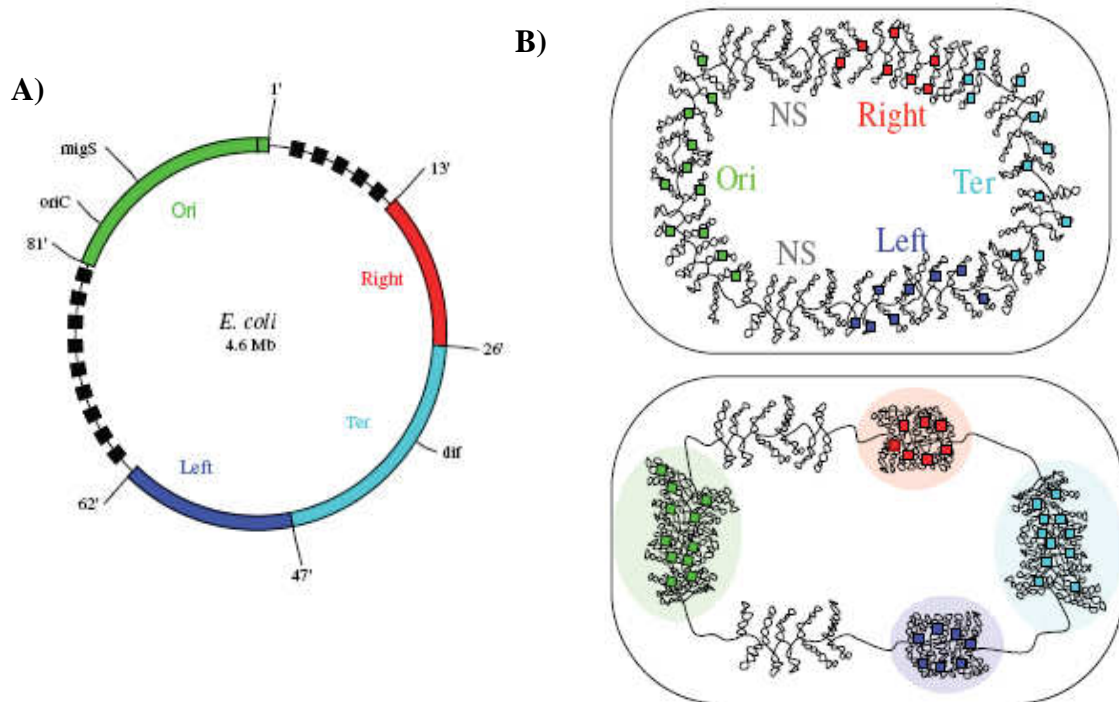


**Figure 22 : Régulation de l'homéostasie de la topologie de l'ADN grâce aux topoisomérases et aux régulateurs transcriptionnels Fis, ppGpp et CRP (d'après Travers et Muskhelishvili, 2005).** Le régulateur global majeur de l'homéostasie de la topologie de l'ADN est la protéine Fis, dont l'expression est activée par une superhélicité négative élevée. La protéine Fis réprime l'expression de la gyrase, limitant ainsi le niveau de superhélicité. L'activité de la gyrase est également modulée par la disponibilité en énergie, représentée par le ratio ATP/ADP, et augmentée lors de l'addition de nutriments (shift-up). La protéine Fis active également la production de la topoisomérase I (*topA*) dans certaines conditions de stress. D'autres réseaux de régulation globale (la réponse stringente, CRP) interviennent également dans cette régulation. Les gènes sont représentés par les rectangles verts, les molécules et protéines en orange. Les traits rouges symbolisent la répression de transcription, les traits bleus, l'activation. Les flèches en pointillés symbolisent l'expression des gènes. Le niveau de superhélicité est schématisé par les molécules d'ADN plus ou moins superenroulées.

21). Au début de la phase de croissance exponentielle, la concentration intracellulaire de Fis atteint son niveau maximal puis décroît par la suite jusqu'à devenir indétectable en phase stationnaire (Ball *et al.*, 1992 ; Nilsson *et al.*, 1992 ; Ninnemann *et al.*, 1992) (Figs.9 et 21). La composition cellulaire en protéines associées au nucléoïde est complètement remaniée lors du passage en phase stationnaire, sous l'influence notamment de (p)ppGpp et RpoS, dont la concentration est élevée pendant cette phase (Figs.9 et 21). La production d'un certain nombre de protéines du nucléoïde, comme IHF ou Dps, augmente. La protéine Dps se lie de façon non spécifique à l'ADN et contribue à le protéger contre les dommages liés au stress oxydatif en le compactant (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2004 ; Nair et Finkel, 2004 ; Almiron *et al.*, 1992).

Certaines protéines de type histone contrôlent également le degré de superhélicité du chromosome par régulation de l'expression des gènes codant les topoisomérases. Par exemple, Fis est un répresseur de la transcription des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant la gyrase (Schneider *et al.*, 1999) et, dans des conditions de stress oxydatif, un activateur du gène *topA*, codant la topoisomérase I (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000) (Fig. 22). En retour, la transcription de *fis* est activée par une superhélicité négative élevée, ce qui est le cas lors d'un apport de nutriments (Schneider *et al.*, 2000b). Ceci explique la forte induction de *fis* en début de phase exponentielle. L'induction de *fis* par une forte superhélicité négative, ainsi que l'effet répresseur de Fis sur la transcription des gènes *gyrA* et *gyrB* entraîne une régulation homéostatique du niveau de superhélicité dans la cellule (Schneider *et al.*, 2000b). En plus de ce rôle global sur la superhélicité de l'ADN, Fis exerce un contrôle plus local. En effet, la liaison de Fis en amont des promoteurs qu'elle régule provoque une augmentation de la superhélicité négative locale et facilite l'initiation de la transcription (Muskhelishvili *et al.*, 1997). Fis se lie notamment au niveau de l'UAS (Upstream Activating Sequence), en amont des promoteurs d'opérons d'ARN stables, et active leur transcription (Nilsson *et al.*, 1990, Ross *et al.*, 1990). La protéine Fis module ainsi la superhélicité locale de l'ADN de façon à maintenir certains promoteurs dans une conformation active, même si la superhélicité globale du chromosome devient défavorable.

Comme Fis, les autres protéines de type histone sont également des régulateurs de la transcription d'un certain nombre de gènes. Par exemple, la protéine H-NS régule la transcription de plus de 200 gènes chez *E. coli*, dont la plupart sont impliqués dans la réponse aux fluctuations de l'environnement (Hommais *et al.*, 2001). Elle agit principalement en tant que répresseur de la transcription en se liant préférentiellement à l'ADN courbé en amont de certains promoteurs et en polymérisant sur l'ADN (Yamada *et al.*, 1990, 1991 ; Schroder et Wagner, 2000 ; Tendeng et Bertin, 2003 ; Rimsky *et al.*, 2001). Cependant, elle agirait



**Figure 23 : Représentation schématique de l'organisation en macrodomaines du chromosome d'*E. coli*** (d'après Boccard *et al.*, 2005). **A) Carte génétique du chromosome d'*E. coli*.** Les régions de couleur représentent les différents macrodomaines majeurs : Ori, comprenant l'origine de réplication du chromosome, Ter, comprenant les sites de terminaison de la réplication, ainsi que les macrodomaines mineurs (à droite et à gauche du macrodomaine Ter), les carrés noirs délimitent deux régions moins structurées. **B) Modèle d'organisation du chromosome d'*E. coli*.** En haut : le chromosome est organisé en anneau avec 4 macrodomaines, et deux régions moins structurées (NS). Des sites de fixation de facteurs non identifiés sont dispersés à travers le chromosome. En bas : la liaison de facteurs à des déterminants génétiques répétés possédant une adresse spatiale définie concentre les régions de l'ADN contenant ces sites, définissant ainsi des macrodomaines de plus de 1000kb. Les macrodomaines n'entrent pas en contact entre eux. Les domaines non structurés ne contiendraient pas de déterminants et pourraient interagir avec les macrodomaines adjacents.

également en activant l'expression de gènes contrôlés négativement par (p)ppGpp, via une augmentation de la superhélicité négative au niveau des promoteurs de ces gènes (Johansson *et al.*, 2000).

#### **IV.1.3. Organisation du chromosome en domaines topologiques**

Chez les eubactéries, différents niveaux de condensation aboutiraient à la compaction du chromosome. Tout d'abord, les protéines associées au nucléoïde assureraient le premier degré de condensation en formant des domaines de l'ordre de 10 à 100pb (Azam *et al.*, 2000). Ensuite, des protéines de type SMC (maintenance structurale du chromosome), telles que MukBEF (Niki *et al.*, 1991 ; Case *et al.*, 2004), assureraient un niveau plus élevé de condensation en compactant l'ADN en une structure répétitive stable (Case *et al.*, 2004 ; Hirano, 2006 ; Strunnikov, 2006 ; Fennell-Fezzie *et al.*, 2005). Troisièmement, les chromosomes bactériens seraient organisés en domaines topologiques indépendants qui limitent la diffusion de la superhélicité négative. La taille de ces domaines est estimée à 10kb grâce à l'observation de nucléoïdes isolés en microscopie électronique et l'analyse de l'expression de gènes sensibles au niveau de superhélicité après cassure contrôlée du chromosome (Postow *et al.*, 2004). Des barrières permettant d'éviter la diffusion de superhélicité semblent disposées de façon aléatoire sur le chromosome (Higgins *et al.*, 1996), la nature de ces barrières étant inconnue (Deng *et al.*, 2004). Enfin, des régions du chromosome de 800 à 1000 kb appelées macrodomaines apparaissent très condensées et semblent se localiser à des positions spécifiques dans la cellule (Lin *et al.*, 1997 ; Niki *et al.*, 2000 ; Wu et Errington, 2002) (Fig.23). Chez *E. coli*, le chromosome est divisé en deux macrodomaines majeurs de 1Mb contenant l'origine et le terminus de réplication (domaines Ori et Ter). Deux autres macrodomaines mineurs sont situés de part et d'autre du domaine Ter. Les régions situées de part et d'autre du domaine Ori ne semblent pas individualisées en macrodomaines. Le chromosome d'*E. coli* serait donc organisé en anneau avec 4 régions très structurées et deux régions moins organisées (pour revue Boccard *et al.*, 2005) (Fig.23).

L'organisation du chromosome en domaines topologiques est dynamique et permettrait d'orchestrer les mouvements du nucléoïde pendant le cycle cellulaire. Il a été montré que quelques régions du chromosome, principalement l'origine de réplication et le macrodomaine Ter, sont localisées spécifiquement dans certaines régions de la cellule, et subissent une relocalisation durant le cycle cellulaire (Gordon *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 2002 ; 2003 ; Lau *et al.*, 2003).

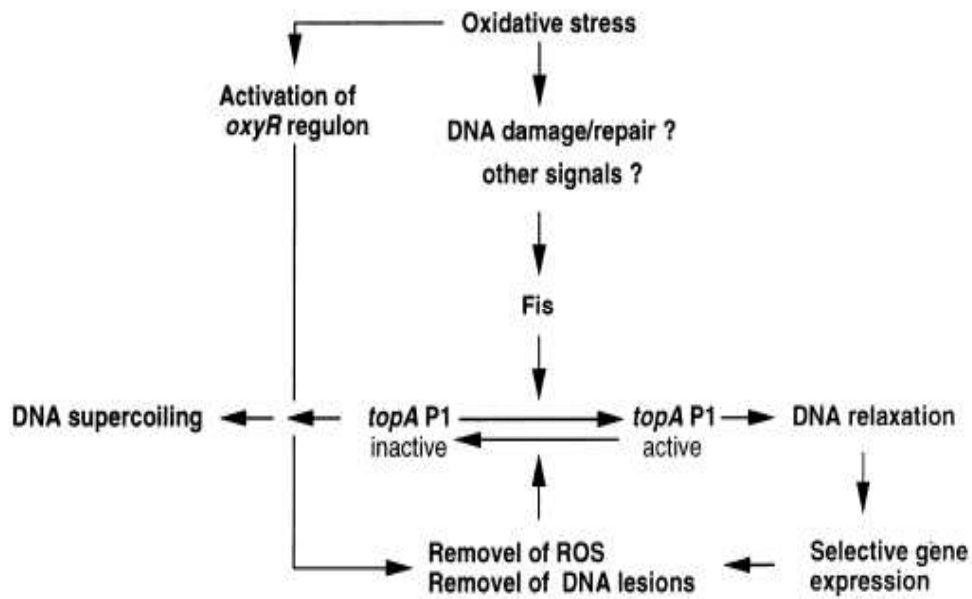


L'organisation très structurée du nucléoïde joue un rôle très important dans l'expression coordonnée des gènes. En effet, il a été observé que des inversions de portions de chromosome, impliquant d'une part un macrodomaine mineur et d'autre part un macrodomaine majeur, et conduisant notamment à une asymétrie entre l'origine et le terminus de réplication, provoquent des défauts de croissance. Ceci indique que la formation de macrodomaines hybrides est délétère pour la bactérie (Valens *et al.*, 2004).

#### **IV.1.4. La régulation homéostatique de la superhélicité**

La superhélicité est impliquée dans de nombreux processus vitaux (recombinaison de l'ADN, transcription, réplication du chromosome, réparation de l'ADN), qui nécessitent un degré de superhélicité négative précis. Une superhélicité négative trop élevée est délétère pour les bactéries (Drolet, 2006). Un mutant du gène *topA*, codant la topoisomérase I, présente en effet une croissance lente, améliorée par l'apparition de mutations suppresseurs dans les gènes *gyrA* et *gyrB*, restaurant un niveau de superhélicité adéquat (Drlica, 1992 ; DiNardo *et al.*, 1982 ; Pruss *et al.*, 1982). Une superhélicité négative trop élevée perturbe l'élongation de la transcription, et entraîne la synthèse d'ARNm et ARNr incomplets (Baaklini *et al.*, 2004 ; Hraiky *et al.*, 2000 ; Drolet *et al.*, 2003). D'autre part, un niveau de superhélicité négative trop faible est également néfaste pour les bactéries. En effet, la transcription globale et l'initiation de la réplication du chromosome sont favorisées par une superhélicité négative élevée (Funnell *et al.*, 1987 ; Arnold et Tessman, 1988 ; Pruss et Drlica, 1989). Le niveau de superhélicité du chromosome doit donc être contrôlé de façon très précise.

Les topoisomérases sont les acteurs principaux de la régulation homéostatique de la superhélicité. En introduisant des supertours positifs (topoisomérase I) ou négatifs (gyrase), elles contribuent à résoudre les problèmes topologiques liés à la transcription, la recombinaison, la réplication, ce qui permet de maintenir un niveau stable de superhélicité (Champoux, 2001). La protéine associée au nucléoïde Fis joue également un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de la superhélicité du chromosome. D'une part, elle se fixe de façon globale sur le chromosome et induit une topologie contrainte. D'autre part, elle réprime la transcription des gènes *gyrA* et *gyrB*, codant les deux sous-unités de la gyrase, impliquée dans l'élévation du niveau de superhélicité négative de l'ADN (Schneider *et al.*, 1999) (Fig.22). Elle régule ainsi de façon directe et indirecte le niveau de superhélicité du chromosome. En retour, la transcription de *fis* est régulée par le degré de superhélicité du chromosome (Schneider *et al.*, 2000b). En effet, en cas d'accroissement de superhélicité



**Figure 24 : Modèle de régulation de la superhélicité de l'ADN lors d'un stress oxydatif et conséquences sur l'expression des gènes (d'après Weinstein-Fischer, 2000).** L'exposition des cellules au peroxyde d'hydrogène active à la fois le régulon OxyR et la topoisomérase I. L'induction de la transcription de *topA* via Fis, activée par des signaux inconnus, provoquerait la relaxation temporaire de l'ADN et une modification sélective de l'expression des gènes. Combiné avec l'expression du régulon OxyR, ce mécanisme permettrait l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que la réparation des dommages induits par ces ROS, notamment au niveau de l'ADN. La disparition du stress conduirait alors à nouveau à une diminution de la transcription de *topA* et à une augmentation de superhélicité négative de l'ADN. L'expression des gènes reviendrait alors à leur niveau initial.

négative, la production de Fis augmente, réprimant ainsi la production de la gyrase et stabilisant le niveau de superhélicité de l'ADN (Schneider *et al.*, 2000b) (Fig.22). Cette boucle de rétroaction négative, dont Fis représente le pivot, permet de coupler la physiologie cellulaire au degré de superhélicité du chromosome. La protéine Fis régule également la transcription de *topA*, codant la topoisomérase I, dans certaines conditions de stress (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000) (Figs.22 et 24).

Cependant, ce système n'explique pas de quelle façon les signaux de l'environnement, par exemple les conditions de stress, sont détectés et entraînent une modification de superhélicité, aboutissant à un ajustement de l'expression des gènes.

## **IV.2. Topologie de l'ADN et expression des gènes**

Le niveau de superhélicité négative de l'ADN régule l'expression de nombreux gènes cibles (Steck *et al.*, 1993 ; Peter *et al.*, 2004), dont la transcription des opérons d'ARN ribosomiques (Muskhelishvili et Travers, 2003). La comparaison de la transcription globale d'une souche d'*E. coli* dont le chromosome présente un défaut de superhélicité (inhibition de la gyrase) avec une souche sauvage révèle que l'expression de 7% des gènes est affectée par le niveau de superhélicité (Peter *et al.*, 2004). La relaxation du chromosome provoque l'activation de transcription de 106 gènes et l'inhibition de 200 gènes remplissant diverses fonctions et dispersés sur le chromosome. Les gènes induits présentent une richesse en AT importante à la fois au niveau des promoteurs et des régions codantes, ce qui n'est pas le cas des gènes dont l'expression est réprimée dans ces conditions (Peter *et al.*, 2004). Une superhélicité négative élevée réprimerait l'échappement de l'ARN polymérase au niveau de promoteurs riches en AT ainsi que l'élongation de la transcription (Peter *et al.*, 2004). D'autre part, cela favoriserait l'ouverture des complexes ARN polymérase – promoteurs riches en GC, facilitant ainsi l'initiation de la transcription. Le niveau de superhélicité aurait donc un impact important sur les gènes nécessaires à la croissance, tels que les opérons d'ARN ribosomiques, qui présentent une séquence discriminatrice riche en GC et sont réprimés par (p)ppGpp.

D'autre part, une augmentation de la superhélicité négative du chromosome provoquée par une mutation du gène *topA* entraîne une réorganisation de l'expression des gènes (Steck *et al.*, 1993). Des effets similaires sont obtenus par mutation du gène *hupA*, codant la sous-unité  $\alpha$  de la protéine associée au nucléoïde HU, qui provoque une compaction du chromosome (Kar *et al.*, 2005).

La superhélicité de l'ADN pourrait donc représenter un élément majeur de l'adaptation des bactéries à leur environnement en ajustant la transcription globale des gènes en fonction des conditions de croissance.

### IV.3. Fluctuations de l'environnement et superhélicité de l'ADN

Les conditions de l'environnement, notamment l'alternance entre des conditions de croissance et de carence ainsi que les stress, influencent fortement le niveau de superhélicité du chromosome bactérien.

En phase de croissance exponentielle, le chromosome est caractérisé par une superhélicité négative élevée (Fig.9). De nombreuses études ont montré que le niveau de superhélicité négative du chromosome était fonction de la charge énergétique cellulaire. En effet, l'activité enzymatique de la gyrase est contrôlée par le ratio intracellulaire [ATP]/[ADP] (Westerhoff *et al.*, 1988 ; Hsieh *et al.*, 1991) (Fig.22). Ainsi, lorsque ce ratio augmente, l'activité de la gyrase est accrue, ce qui augmente la superhélicité négative du chromosome (Westerhoff *et al.*, 1988 ; Hsieh *et al.*, 1991 ; Drlica, 1992). Ceci favorise l'expression de certains gènes nécessaires à une croissance optimale comme les opérons d'ARN stables (Kusano *et al.*, 1996). A l'entrée en phase stationnaire, la charge énergétique globale de la cellule ([ATP]/[ADP]) chute et entraîne une diminution de superhélicité négative du chromosome (Fig.9). Ceci favorise la transcription de promoteurs par l'ARN polymérase associée au facteur  $\sigma^S$  (Hengge-Aronis, 2002a ; Bordes *et al.*, 2003 ; Kusano *et al.*, 1996) et donc la transcription de gènes impliqués dans la résistance aux carences nutritionnelles. Lorsque les cellules sont remises en présence de nutriments, la charge énergétique globale augmente à nouveau, provoquant un accroissement de superhélicité négative du chromosome favorisant la reprise de croissance.

La topologie de l'ADN varie également lors de stress osmotiques, oxydatifs ou thermiques. Ceci entraîne un changement transitoire de l'expression des gènes permettant notamment l'induction de gènes nécessaires à la survie et à l'élimination du stress. Lorsque les conditions redeviennent favorables, l'expression des gènes revient à la normale. En réponse au stress osmotique, la superhélicité négative du chromosome augmente (Higgins *et al.*, 1988). Ceci permet d'activer les gènes nécessaires à la résistance des bactéries à ce type de stress, comme *proU*, codant un système de transport d'osmoprotecteurs tels que la glycine et la bétaine (Cheung *et al.*, 2003 ; Higgins *et al.*, 1988). Une inactivation du gène *topA*,

codant la topoisomérase I dont le rôle est de relâcher l'ADN, provoque une augmentation du niveau de superhélicité, mimant ainsi les effets d'un stress osmotique et activant l'expression du gène *proU* (Higgins *et al.*, 1988). Lors d'un stress oxydatif, la protéine Fis active la transcription du gène *topA*, ce qui entraîne une diminution transitoire du niveau de superhélicité de l'ADN (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000) (Figs.22 et 24). Ceci entraîne l'induction des gènes de réparation des dommages et de détoxification des espèces réactives de l'oxygène, permettant ainsi d'éliminer le stress. Le niveau de superhélicité revient alors à la normale ainsi que l'expression des gènes (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000). La topologie de l'ADN varie également avec la température (Mizushima *et al.*, 1994 ; Ogata *et al.*, 1997). Lors d'un choc thermique, l'expression de la topoisomérase I est activée, aboutissant à une diminution du niveau de superhélicité négative, (Lesley *et al.*, 1990).

La superhélicité de l'ADN représente donc un point de contrôle clé de l'adaptation des bactéries aux transitions nutritionnelles et aux stress environnementaux, de la même façon que la réponse stringente. Ces deux réseaux de régulation globale présentent de nombreux points communs et sont très interconnectés. Ils participent de façon concertée à la réponse bactérienne aux fluctuations de l'environnement.

#### **IV.4. La topologie de l'ADN et la réponse stringente : 2 réseaux intimement connectés**

Les études menées depuis de nombreuses années sur les mécanismes de régulation des gènes liés à la réponse stringente et à la superhélicité de l'ADN ont démontré que ces deux réseaux représentent des points de contrôle permettant l'adaptation des bactéries aux transitions nutritionnelles et aux stress. Un certain nombre de points communs entre ces deux réseaux démontrent un fonctionnement coordonné permettant l'intégration de différents signaux environnementaux et une réponse adaptée des bactéries (Travers et Muskhelishvili, 2005) (Figs.9 et 22).

La topologie de l'ADN et la réponse stringente représentent des régulateurs majeurs du taux de croissance des cellules en modulant la transcription des ARN stables en fonction des conditions de croissance. La phase de croissance exponentielle est caractérisée par un niveau basal de (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996), ainsi qu'une élévation du niveau de superhélicité négative du chromosome, provoquée par l'augmentation de la charge énergétique globale (Drlica, 1992). L'absence de (p)ppGpp évite la déstabilisation des

complexes d'initiation de la transcription et le niveau de superhélicité négative élevé permet de surmonter la barrière énergétique posée par le discriminateur au niveau des promoteurs d'opérons d'ARN stables. Tout ceci favorise donc leur transcription (Auner *et al.*, 2003 ; Schneider *et al.*, 2000b ; Travers et Muskhelishvili, 2005). A ces phénomènes se superpose la régulation de *fis*, un autre activateur de la transcription des opérons d'ARN stables. L'expression de *fis* est réprimée lorsque le niveau de (p)ppGpp est important et activée par une superhélicité négative élevée. En phase exponentielle, les conditions sont donc réunies pour activer l'expression de *fis* (Schneider *et al.*, 2000b). L'ensemble de ces phénomènes, imbriquant réponse stringente et superhélicité de l'ADN, entraîne donc une transcription maximale des opérons d'ARN stables pendant la phase de croissance exponentielle, favorisant fortement la croissance des bactéries (Lamond, 1985 ; Ohlsen et Gralla, 1992 ; Free et Dorman, 1994).

A l'inverse, en phase stationnaire, la charge énergétique globale diminue, entraînant une diminution du niveau de superhélicité négative de l'ADN. De plus, les conditions de carence nutritionnelle rencontrées par les cellules provoquent l'activation de la synthèse de (p)ppGpp par RelA et l'inhibition de sa dégradation par SpoT, ce qui aboutit à l'accumulation d'une concentration importante de (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996). (p)ppGpp a pour effet de déstabiliser les complexes ouverts, notamment au niveau des promoteurs stringents, dont font partie les promoteurs d'opérons d'ARN stables, ce qui provoque l'inhibition de leur transcription et la libération d'une quantité importante de molécules d'ARN polymérase (Zhou et Jin, 1998). De plus, le niveau de superhélicité négative n'est plus suffisant pour surmonter la barrière énergétique du discriminateur. Ceci aboutit donc à une répression de la transcription des ARN stables. (p)ppGpp agit également en réprimant l'expression de *fis* (Dennis *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Nilsson *et al.*, 1992 ; Ninnemann *et al.*, 1992). A l'entrée en phase stationnaire, la transcription des ARN stables est donc fortement réprimée, aboutissant à une diminution drastique du taux de croissance. En libérant des molécules d'ARN polymérase, l'accumulation de (p)ppGpp permet de réorienter la transcription vers des gènes nécessaires à la résistance au stress, notamment les gènes de biosynthèse d'acides aminés, dont les promoteurs possèdent une affinité limitée pour l'ARN polymérase (Barker *et al.*, 2001a et b). D'autre part, (p)ppGpp favorise la fixation des facteurs sigmas alternatifs à l'ARN polymérase, permettant l'activation de régulons impliqués dans la résistance aux stress (Jishage *et al.*, 2002 ; Laurie *et al.*, 2003). De plus, la transcription de l'ARN polymérase associée au facteur sigma spécifique de la phase stationnaire  $\sigma^S$  est favorisée par un niveau de superhélicité négative faible (Kusano *et al.*, 1996 ; Bordes *et al.*,

2003). Tout ceci permet aux cellules de s'adapter aux conditions de stress. Lorsque les conditions redeviennent favorables, le niveau de (p)ppGpp redevient basal suite à l'action de SpoT qui le dégrade (Cashel *et al.*, 1996). De plus, le niveau de superhélicité négative augmente à nouveau (Westerhoff *et al.*, 1988). Ceci permet aux cellules de réajuster l'expression de leurs gènes aux nouvelles conditions et de reprendre une croissance normale.

Les deux réseaux agissent également de concert pour permettre aux bactéries de s'adapter à des conditions de stress osmotiques, thermiques ou oxydatifs. Lors de tels stress, le niveau de superhélicité est modifié de façon transitoire, ce qui permet un changement momentané de l'expression globale des gènes (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000 ; Higgins *et al.*, 1988). D'autre part, une réponse stringente dépendante de SpoT est également déclenchée en réponse à certains stress (Harshman et Yamazaki, 1972 ; Gallant *et al.*, 1977) (voir section III.2.3). Ceci permet aux cellules de s'adapter à ces conditions et de déclencher des réponses nécessaires à l'élimination des stress.

Enfin, ces deux réseaux se situent au sommet de la régulation globale de la cellule en modulant la production ou l'activité de certains régulateurs globaux. Par exemple, l'activité de RpoS, qui régulent l'expression de plus de 100 gènes, est optimale en phase stationnaire, lorsque la superhélicité négative de l'ADN est faible et la concentration de (p)ppGpp élevée (Bordes *et al.*, 2003 ; Hengge-Aronis, 2002). D'autre part, comme nous l'avons déjà souligné, la transcription du gène *fis* est activée en phase exponentielle, lorsque le niveau de superhélicité négative du chromosome est élevé et que la concentration intracellulaire de (p)ppGpp est faible (Dennis *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Nilsson *et al.*, 1992 ; Ninnemann *et al.*, 1992) (Fig.9).

La superhélicité de l'ADN et la réponse stringente coordonnent donc le comportement global d'un organisme face aux fluctuations de l'environnement, notamment les transitions nutritionnelles et les stress. Tout ceci suggère que ces deux réseaux pourraient jouer un rôle important dans l'évolution et l'adaptation des bactéries à leur environnement. Pour le démontrer, l'idéal serait de pouvoir analyser et comparer ces réseaux à différents temps évolutifs chez une souche ancêtre et les individus qui en dérivent dans l'environnement fossile dans lequel ils auraient évolué. Il serait aussi intéressant de faire évoluer des bactéries dans des conditions où elles rencontrent des transitions nutritionnelles répétées. Ceci permettrait de répondre à différentes questions : d'une part, quels types de gènes sont les cibles de la sélection naturelle, c'est-à-dire, les bactéries s'adaptent-elles aux conditions de culture en modifiant des gènes de structure ou de régulation ? D'autre part, si des gènes

régulateurs sont modifiés, cela affecte-t-il les réseaux de régulation globale ? Enfin, comment ces changements se manifestent-ils au niveau phénotypique ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons utilisé une stratégie d'évolution expérimentale au cours de laquelle les bactéries ont été propagées dans un environnement défini pendant plus de 40 000 générations. Cette stratégie, exposée dans le chapitre suivant, a pour particularité d'imposer aux bactéries des transitions quotidiennes entre des conditions favorables à la croissance et des conditions de carence. Elle peut donc permettre de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'adaptation des bactéries aux transitions nutritionnelles et de répondre aux questions ci-dessus.



## V. La stratégie d'évolution expérimentale

---

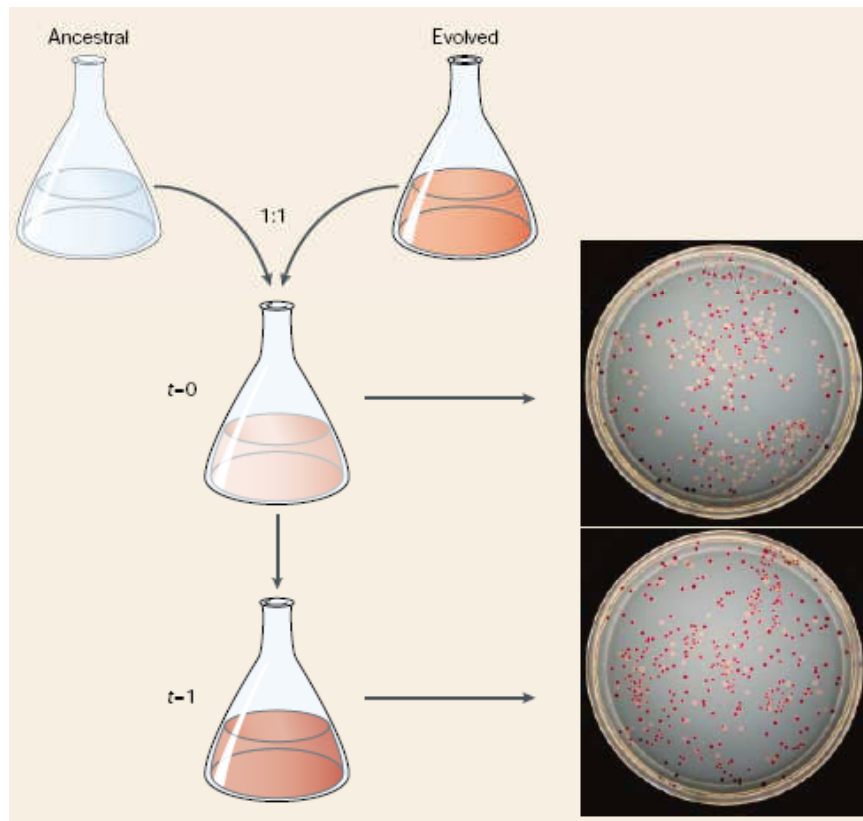
### V.1. Le système expérimental

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires permettant l'adaptation d'*E. coli* à des alternances entre des conditions d'abondance et de manque nutritionnel, nous nous sommes basés sur une stratégie d'évolution expérimentale mise au point et initiée par Richard Lenski (Michigan State University, USA) en 1988.

Depuis 1988, douze populations d'*E. coli* sont propagées dans un environnement constant par transferts journaliers à partir d'un ancêtre commun (Lenski *et al.*, 1991 ; Lenski et Travisano, 1994). L'environnement utilisé est un milieu minimum appelé DM25 (Davis Minimal) contenant une concentration limitante de glucose (0,0025%) comme seule source de carbone. Toutes les populations sont issues soit d'un clone ancêtre d'*E. coli* B incapable d'utiliser l'arabinose comme source de carbone (Ara-) (Lederberg, 1966, Schneider *et al.*, 2002), soit d'un dérivé Ara+ de ce clone. La capacité à utiliser l'arabinose est utilisée comme marqueur dans les expériences de compétition (voir section V.2.1). Tous les jours, les bactéries rencontrent une phase de latence suivie d'une période de croissance exponentielle. Puis le glucose s'épuise, et les bactéries font face à une période de carence où leur croissance s'arrête. Le jour suivant, les bactéries sont diluées au 1/100<sup>ème</sup> dans du milieu frais et leur croissance redémarre. Chaque jour, elles se divisent à raison de 6,64 générations ( $\log_2 100$ ), et une concentration d'environ  $5 \cdot 10^7$  UFC/mL est obtenue en phase stationnaire (l'environnement consiste en 10mL de milieu de culture). Nous disposons aujourd'hui de plus de 40 000 générations d'évolution expérimentale, et ce 12 fois de façon indépendante à partir d'un ancêtre commun, ce qui représente plusieurs millions d'années à l'échelle humaine.

Outre les nombreux avantages liés à *E. coli* (multiplication rapide et clonale, grande taille de populations, données disponibles très nombreuses), ce système d'évolution expérimentale présente un certain nombre d'autres atouts :

i) des fractions aliquotes de la souche ancêtre ainsi que de chacune des douze populations ont été congelées à -80°C à des intervalles de temps réguliers (toutes les 500 à 1000 générations). Des clones évolués individualisés peuvent ainsi être isolés à partir de ces populations au cours du temps, et leurs phénotypes et génotypes peuvent être comparés à ceux de l'ancêtre.



Fitness évolué / ancêtre : 
$$W_{e/a} = \frac{\ln(D_1^e/D_0^e * 100)}{\ln(D_1^a/D_0^a * 100)}$$

**Figure 25 : Principe des expériences de compétition, destinées à mesurer le fitness des clones évolués (d'après Elena et Lenski, 2003).** Les deux compétiteurs, de marqueur arabinose opposé, sont d'abord cultivés séparément dans le milieu de l'évolution expérimentale (milieu minimum DM glucose). Ils sont ensuite mis en co-culture (compétition) par dilution 1/100 dans le même milieu. Les proportions relatives de chaque compétiteur sont évaluées au moment du mélange et au bout de 24h par dilutions et étalements sur un milieu solide comportant du tétrazolium et de l'arabinose. Ce milieu permet de distinguer chaque compétiteur, les clones Ara- apparaissant rouges, et les clones Ara+ roses. Chaque expérience est réalisée six fois de façon indépendante. Le fitness du clone en compétition contre l'ancêtre est calculé en effectuant le rapport des taux de croissance de chaque souche. ( $D_0$  : nombre de colonies au moment du mélange,  $D_1$  : nombre de colonies à 24h, e : clone évolué, a : ancêtre). Ce système peut être utilisé pour déterminer le fitness de n'importe quelle souche d'intérêt et notamment l'avantage apporté par des mutations isolées introduites dans le chromosome de l'ancêtre par recombinaison homologue.

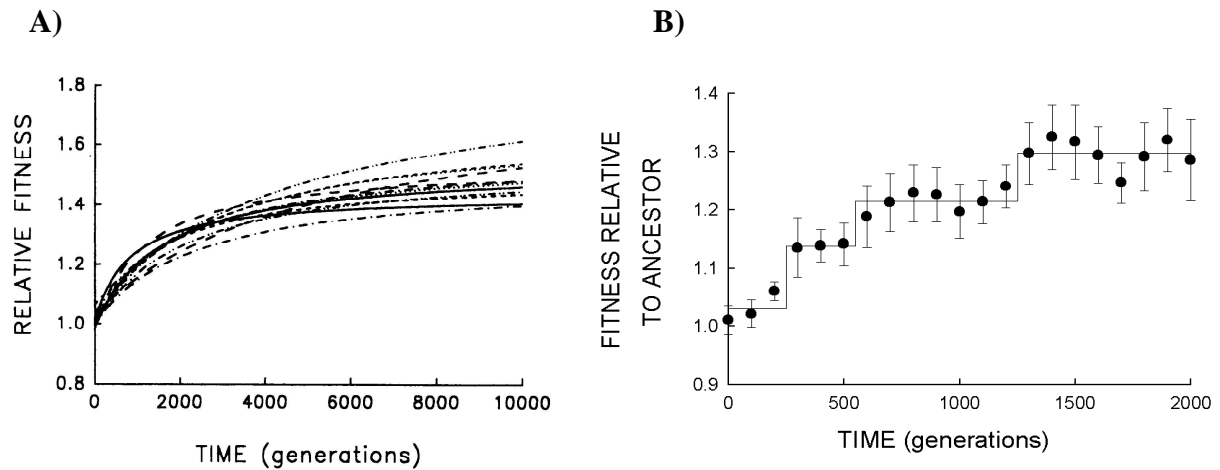
ii) Les mutations identifiées au cours de cette évolution peuvent être introduites par recombinaison homologue dans le chromosome de l'ancêtre et de tout clone évolué, au moyen de plasmides suicide (Philippe *et al.*, 2004 ; Link *et al.*, 1997). Les effets phénotypiques spécifiques de chaque mutation peuvent donc être analysés, et ce dans n'importe quel contexte génétique et dans différents environnements. De plus, le moment d'apparition de chaque mutation peut être déterminé.

## **V.2. Evolution phénotypique des douze populations : parallélisme de l'évolution**

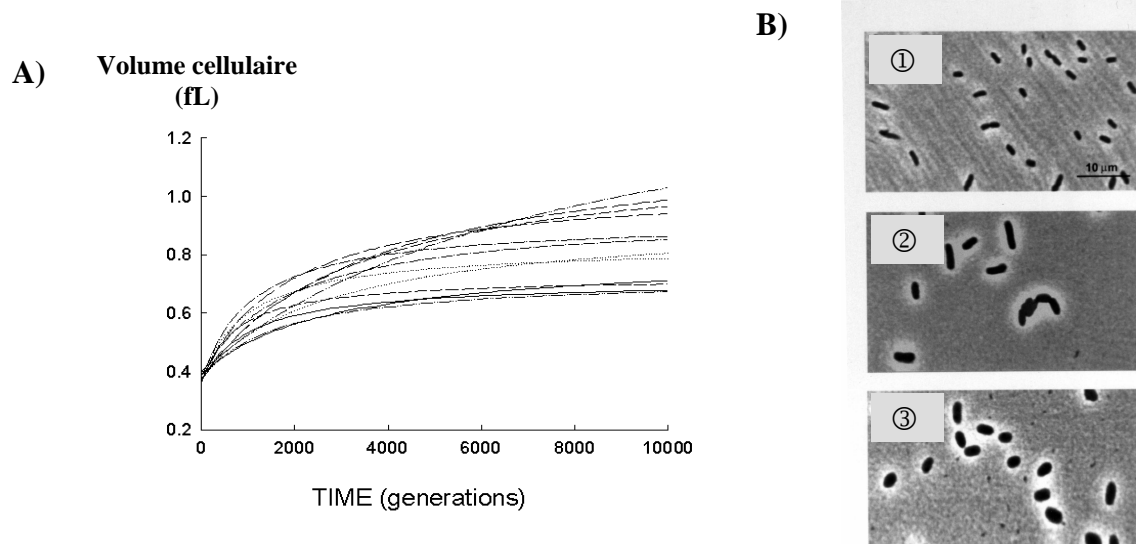
### **V.2.1. Augmentation de la capacité de reproduction : le fitness**

Six des douze populations, appelées Ara-1 à Ara-6, sont dérivées d'un clone ancêtre incapable d'utiliser l'arabinose comme source de carbone (Ara-). Les six autres populations, Ara+1 à Ara+6, sont dérivées d'un variant Ara+ de cet ancêtre. La capacité à utiliser l'arabinose comme source de carbone est utilisée comme marqueur dans des expériences de compétition, destinées à mesurer le fitness des clones évolués, c'est-à-dire leur capacité de reproduction (Fig.25). Ce marqueur est neutre dans les conditions de l'évolution expérimentale (Lenski *et al.*, 1991). Il permet de distinguer les compétiteurs qui présentent une couleur différente sur un milieu solide particulier, contenant du tétrazolum et de l'arabinose (TA). Les colonies bactériennes Ara- apparaissent rouges, tandis que les colonies Ara+ sont roses. Les compétitions consistent à mettre en co-culture deux individus de marqueur arabinose opposé (par exemple l'ancêtre Ara- et un autre individu Ara+), puis à mesurer les proportions de chaque compétiteur à un temps donné pour définir si une souche présente un avantage sélectif (Fig.25). Le fitness est mesuré en calculant le ratio des taux de croissance des deux compétiteurs.

La trajectoire d'évolution du fitness des 12 populations a été déterminée en mesurant la compétitivité des populations au cours de leur évolution (toutes les 500 à 1000 générations) par rapport à la souche ancêtre de marqueur arabinose opposé (Fig.26) (Lenski et Travisano, 1994 ; Cooper et Lenski, 2000). Le fitness des 12 populations augmente d'environ 70% au cours des 20 000 premières générations (Cooper et Lenski, 2000), ce qui démontre l'adaptation des bactéries à leur environnement. Cette augmentation de fitness est similaire au sein des 12 populations, ce qui révèle une évolution phénotypique parallèle. La trajectoire de



**Figure 26 : Evolution parallèle du fitness chez les clones évolués par rapport à l'ancêtre. A) Trajectoire moyenne de fitness de chaque population pendant les 10 000 premières générations de l'évolution expérimentale (d'après Lenski et Travisano, 1994).** Cette trajectoire a été obtenue en mesurant le fitness d'échantillons des 12 populations prélevés toutes les 500 à 1000 générations par rapport à l'ancêtre. Elle présente deux périodes. Le fitness augmente très rapidement pendant 2000 générations puis de façon plus lente au fur et à mesure que les bactéries approchent de leur optimum de fitness. A 10 000 générations, les populations présentent un accroissement de fitness d'environ 50% par rapport à l'ancêtre. **B) Détail de la trajectoire de fitness d'une population modèle pendant les 2000 premières générations (d'après Lenski et Travisano, 1994).** Cette trajectoire a été obtenue en mesurant le fitness de clones isolés dans la population modèle Ara-1 toutes les 100 générations par rapport à l'ancêtre. Une trajectoire en escalier est obtenue qui peut être interprétée par la fixation rapide de mutations successives.



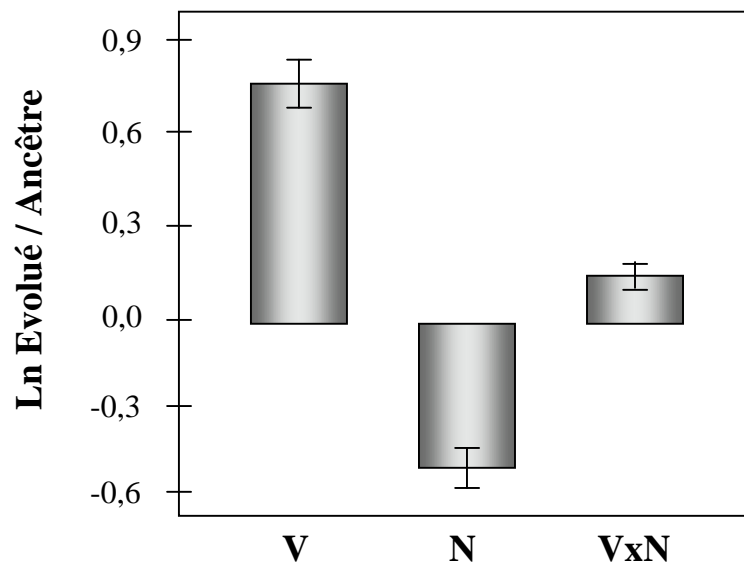
**Figure 27 : Evolution parallèle du volume et de la morphologie cellulaires (d'après Lenski et Travisano, 1994, Lenski et Mongold, 2000).** A) Trajectoire du volume cellulaire des 12 populations pendant 10 000 générations d'évolution expérimentale. Comme le fitness, la trajectoire du volume cellulaire (en fL) présente deux périodes. Le volume augmente très rapidement jusqu'à 2000 générations puis plus lentement jusqu'à 10 000 générations de façon parallèle dans les 12 populations. **B) Micrographies montrant l'évolution de taille et de forme cellulaires** (les photographies sont à la même échelle). ① clone ancêtre, ② population Ara-6 dans laquelle les cellules sont devenues plus longues et plus larges, ③ population Ara+5 dans laquelle les cellules sont devenues plus sphériques.

fitness présente 2 périodes distinctes (Fig.26). Jusqu'à environ 2000 générations, le gain de fitness est très important et rapide. Une résolution plus fine de la trajectoire de fitness durant cette période a été obtenue en mesurant la compétitivité de clones isolés à des intervalles de temps plus courts, c'est-à-dire toutes les 100 générations, dans la population Ara-1 par rapport à l'ancêtre. Cette trajectoire plus précise présente un profil en escaliers, chaque marche représentant la fixation rapide d'au moins une mutation conférant un fort avantage sélectif (Lenski et Travisano, 1994 ; Cooper et Lenski, 2000) (Fig.26). Ceci peut s'expliquer par des événements de sélection périodique, caractéristiques de l'évolution de populations d'organismes asexués (Atwood *et al.*, 1951). En effet, lorsqu'une mutation bénéfique apparaît dans une cellule, celle-ci présente un avantage de croissance par rapport aux autres cellules de la population. Ceci aboutit à l'élimination des cellules ne portant pas l'allèle bénéfique et, à terme, à la fixation de la mutation. La répétition de ces événements de sélection entraîne donc l'adaptation de la population grâce à la fixation successive de mutations apportant un avantage de croissance important.

Après cette période de forte augmentation du fitness, c'est-à-dire après 2000 générations, le fitness continue à augmenter mais de façon beaucoup plus lente, suggérant un ralentissement de l'adaptation. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules sont déjà très adaptées à leur environnement suite à la fixation de nombreuses mutations bénéfiques, et qu'elles se rapprochent de leur optimum de fitness. Ainsi, les mutations bénéfiques fixées après 2000 générations apportent probablement un avantage plus faible et les cellules portant ces mutations nécessitent un temps plus important pour devenir majoritaires au sein de la population (De Visser et Lenski, 2002).

### **V.2.2. Morphologie des cellules et cycle de croissance**

Les clones évolués issus des 12 populations présentent une augmentation significative de la taille et du volume cellulaire, associée à l'augmentation du fitness (Lenski et Mongold, 2000) (Fig.27). De la même façon que la trajectoire de fitness, la courbe représentant l'évolution du volume des cellules présente une augmentation rapide au cours des 2000 premières générations puis un net ralentissement jusqu'à atteindre un plateau (Fig.27A). Ceci démontre une fois de plus une évolution phénotypique parallèle au sein des 12 populations. La morphologie des cellules révèle également des différences au sein des 12 populations et certaines deviennent plus sphériques.



**Figure 28 : Evolution du volume (V) et du nombre de cellules (N) par rapport à l'ancêtre à la fin d'un cycle de culture de 24h (d'après Lenski et Mongold, 2000).** Les clones évolués présentent un volume plus important que l'ancêtre ainsi qu'un nombre de cellules plus faible au bout de 24h de culture dans les conditions de l'évolution expérimentale. Le produit des deux valeurs est supérieur de 20% chez les clones évolués par rapport à l'ancêtre. L'évolution est donc plutôt orientée vers la production de biomasse. L'activité métabolique relative à la masse semble plus faible chez les clones évolués.

Deux hypothèses peuvent expliquer l'augmentation du volume cellulaire au cours de l'évolution. D'une part, ce caractère phénotypique pourrait être une cible de la sélection naturelle et sa modification pourrait apporter un avantage dans les conditions de l'évolution, bien que cela provoque une diminution du rapport surface/volume, *a priori* désavantageuse. D'autre part, l'augmentation de volume cellulaire pourrait être due à un phénomène d' « auto-stop », c'est-à-dire une conséquence de modifications génétiques sans effet sur le fitness, mais liées génétiquement à d'autres mutations bénéfiques fixées dans les populations (Lenski et Travisano, 1994).

L'augmentation du volume cellulaire s'accompagne d'une diminution de l'efficacité d'étalement des populations (Lenski et Mongold, 2000) (Fig.28). Le produit du volume cellulaire par le nombre de cellules augmente de 20% au cours de l'évolution. L'activité métabolique relative à la masse semble donc plus faible chez les clones évolués. Ainsi, l'évolution des cellules est plutôt orientée vers la production de biomasse.

Le cycle de croissance des bactéries est également modifié de façon importante au cours de l'évolution. D'une part, la phase de latence tend à disparaître et d'autre part, le taux de croissance augmente de façon considérable. Tout ceci conduit à une transition précoce en phase stationnaire et donc à un allongement de cette phase. Ces changements phénotypiques interviennent de façon indépendante et parallèle au sein des 12 populations (Vasi et Lenski, 1994 ; Lenski *et al.*, 1998).

### **V.2.3. Capacités métaboliques**

Les capacités métaboliques des 12 populations diminuent de façon parallèle au cours de l'évolution (Cooper et Lenski, 2000 ; Cooper *et al.*, 2001 ; Pelosi *et al.*, 2006). En effet, des tests de catabolisme réalisés sur 64 substrats à 2000, 10 000 et 20 000 générations dans les 12 populations montrent que les clones évolués présentent une capacité réduite à utiliser 16 sources de carbone pendant les 10 000 premières générations, dont 9 pendant les 2000 premières générations. Cette diminution ne s'accroît pas après 10 000 générations (Cooper et Lenski, 2000). La diminution des capacités métaboliques des clones évolués touche des fonctions *a priori* non indispensables dans le milieu de l'évolution où le glucose est la seule source de carbone (ex : ribose, sorbitol, acides saccharique et malique, fructose-6-phosphate, glucose-1-phosphate, sérine, asparagine, aspartate, glutamine...) (Cooper et Lenski, 2000). L'adaptation des bactéries est donc caractérisée par un phénomène de spécialisation écologique qui peut s'expliquer par deux mécanismes différents :

l'accumulation de mutations ou la pleiotropie antagoniste (Cooper et Lenski, 2000). Dans le premier cas, des mutations neutres, voire faiblement délétères dans l'environnement de sélection, s'accumulent dans des gènes non soumis à la sélection naturelle. Le deuxième mécanisme est le reflet de la fixation de mutations bénéfiques dans le milieu de sélection mais ayant des effets pleiotropes pouvant conduire à la perte ou à la réduction d'autres fonctions, ici les capacités métaboliques (Holt, 1996 ; Rose et Charlesworth, 1980). Quatre des 12 populations sont mutatrices, car affectées dans leur système de réparation de l'ADN (Sniegowski *et al.*, 1997 ; Shaver *et al.*, 2002). Si l'accumulation de mutations était le processus majeur impliqué dans la diminution des fonctions cataboliques des clones évolués, alors ces capacités seraient diminuées de façon plus importante au sein des populations mutatrices, ce qui n'est pas le cas. D'autre part, la plupart des diminutions de fonctions interviennent très tôt dans l'évolution, c'est-à-dire avant 2000 générations, pendant la période de forte augmentation du fitness. Ceci suggère que les bactéries s'adaptent à leur environnement en partie par pleiotropie antagoniste (Cooper et Lenski, 2000). Ceci a été confirmé ultérieurement par la mise en évidence de mutations bénéfiques dans l'environnement de sélection (DM25 glucose) affectant l'opéron *rbs* d'utilisation du ribose (Cooper et Lenski, 2000) et le gène *malT*, codant l'activateur des gènes d'utilisation du maltose (Pelosi *et al.*, 2006). Ces mutations conduisent à la perte de la capacité des bactéries à utiliser le ribose et à la diminution de leur capacité à utiliser le maltose comme sources de carbone (voir section V.4).

#### **V.2.4. Modifications parallèles de l'expression des gènes**

Grâce aux techniques d'analyse de l'expression globale des gènes, il est possible de mesurer simultanément des centaines de phénotypes. Les profils globaux de transcription (Cooper *et al.*, 2003) et de protéines (Pelosi *et al.*, 2006) de deux clones évolués indépendants isolés à 20 000 générations dans les deux populations Ara+1 et Ara-1 ont été comparés à ceux du clone ancêtre. Ces deux techniques révèlent que l'expression d'une partie des gènes est modifiée de façon parallèle, c'est à dire dans la même direction, chez les deux clones évolués par rapport à l'ancêtre. En effet, les profils transcriptionnels révèlent la modification parallèle de la transcription de 59 gènes, tandis que les profils protéiques révèlent une modification parallèle de 38 spots protéiques (sur les 300 à 400 protéines visualisées) chez les deux clones évolués par rapport au clone ancêtre. Ceci indique un fort degré de parallélisme évolutif. Conformément à l'hypothèse nulle selon laquelle ces différences reflèteraient des



changements aléatoires pendant l'évolution ou la préparation des échantillons, il n'est pas attendu d'observer une telle correspondance au niveau du sens de changement d'expression des gènes chez les clones évolués par rapport à l'ancêtre. Ainsi, les différences parallèles observées par ces différentes approches ont probablement une signification physiologique et sont vraisemblablement le reflet de mutations bénéfiques qui se sont produites au cours de l'évolution expérimentale.

Tous les changements phénotypiques majeurs caractérisés se produisent de façon parallèle dans la majorité voire la totalité des 12 populations. Le parallélisme phénotypique est la signature de modifications adaptatives (Cunningham *et al.*, 1997). Ainsi, l'étude moléculaire des caractères phénotypiques modifiés de façon parallèle lors de l'évolution pourrait permettre d'identifier les gènes cibles de la sélection naturelle (voir section V.4).

### **V.3. Evolution génotypique : les IS comme marqueurs génomiques**

Une analyse de l'évolution des génomes a été effectuée par RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de restriction) en utilisant des séquences d'insertion (IS) comme marqueurs génomiques, chez les populations Ara-1 et Ara+1 (Papadopoulos *et al.*, 1999). Une vingtaine de clones évolués ont été isolés dans ces populations et leur ADN génomique a été hybridé avec les 7 séquences IS présentes chez *E. coli* B utilisées comme sondes moléculaires. Leurs profils d'hybridation ont été comparés à celui du clone ancêtre et des arbres phylogénétiques ont été construits (Papadopoulos *et al.*, 1999).

La diversité génétique des deux populations augmente de façon importante au cours du temps. Ainsi, à 10 000 générations, la diversité est si grande que les 11 clones analysés dans la population Ara+1 présentent des profils différents, et les 13 clones analysés dans la population Ara-1 présentent 10 profils distincts (Papadopoulos *et al.*, 1999). De plus un contraste important a été observé entre évolution phénotypique et génotypique. Alors que le fitness et le volume cellulaire augmentent rapidement au cours des 2000 premières générations, et de façon beaucoup plus lente par la suite (Lenski et Travisano, 1994 ; Lenski, 2000), la diversité génétique ne présente pas de ralentissement et augmente tout au long de l'évolution expérimentale. Cependant, la diversité génétique n'augmente pas de façon « monotonique ». Des périodes d'accroissement puis de diminution de la diversité, signatures d'évènements de sélection périodique, sont en effet observées. En effet, lorsqu'une mutation bénéfique apparaît dans une cellule au sein d'une population, les autres cellules ne portant pas

la mutation sont progressivement éliminées, diminuant ainsi périodiquement la diversité des génomes et permettant la fixation de la mutation bénéfique. Ces fluctuations confirment donc le rôle majeur joué par la sélection périodique sur l'adaptation des populations asexuées à leur environnement.

Les arbres phylogénétiques ont également permis de mettre en évidence des mutations pivotales. Ces mutations ont été détectées de façon précoce, c'est-à-dire pendant les 2000 premières générations correspondant à fort accroissement de fitness, et ont été ensuite conservées chez tous les clones descendants d'une population. Ces mutations constituent donc de bons candidats pour la recherche de mutations bénéfiques (Papadopoulos *et al.*, 1999 ; Schneider *et al.*, 2000a).

## **V.4. Evolution génétique : identification de mutations bénéfiques**

Les mutations bénéfiques jouent un rôle central dans l'évolution. Cependant, elles représentent une infime fraction de la totalité des mutations et sont donc difficiles à identifier (Fisher, 1930 ; Kimura, 1983). Deux stratégies ont été employées pour identifier les mutations conférant un avantage sélectif : la détermination du site d'insertion des IS correspondant aux mutations pivotales (section V.3), et l'analyse moléculaire de phénotypes modifiés de façon parallèle au sein des 12 populations (section V.2).

### **V.4.1. Mutations liées aux mouvements d'IS**

Comme nous l'avons vu précédemment, des mutations pivotales associées aux IS, détectées de façon précoce puis conservées constituent de bons candidats de mutations bénéfiques (Papadopoulos *et al.*, 1999).

Les sites d'insertion de ces IS ont été caractérisés par PCR inverse en utilisant comme amorces des séquences présentes aux extrémités des IS (Schneider *et al.*, 2000a). Deux types de mutations ont été mis en évidence au sein des deux populations analysées : i) des réarrangements de type délétion ou inversion dus à des recombinaisons homologues entre séquences IS, ii) des événements de transposition d'IS.

Les mutations découvertes par cette méthode dans les populations Ara+1 et Ara-1 affectent des gènes impliqués dans le métabolisme central tels que *nadR*, codant le répresseur des gènes de biosynthèse du NAD, *pykF*, codant la pyruvate kinase I et l'opéron *rbs*, codant les gènes d'utilisation du ribose. D'autres mutations affectent l'opéron *pbpA-rodA*, codant les

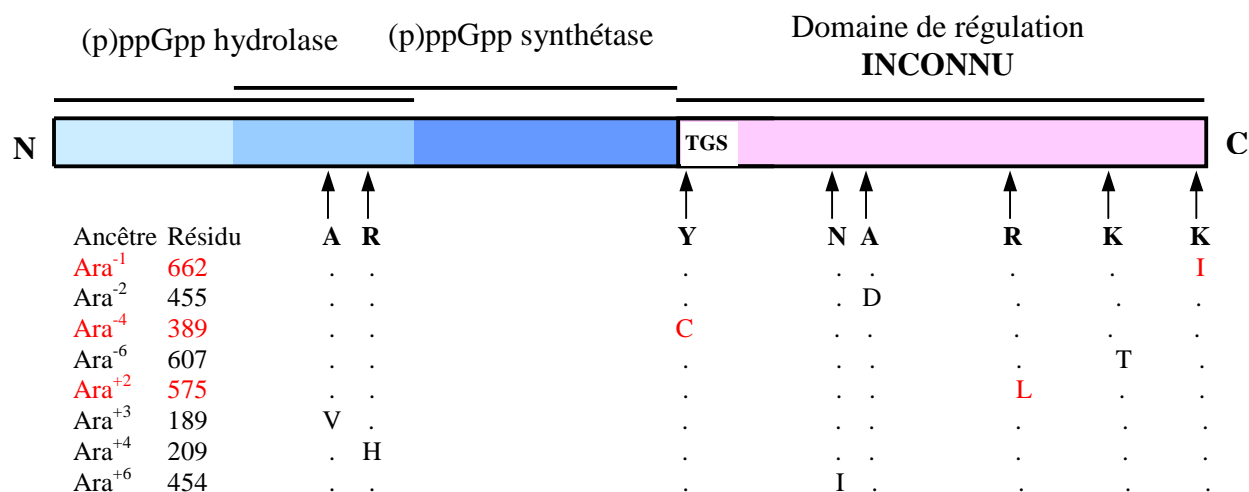
Mutation	Méthode de détection	Fonction du gène	Population initiale	Nombre de populations mutées
<i>pykF</i>	RFLP-IS	Pyruvate kinase I (glycolyse)	Ara-1	12
<i>nadR</i>		Répresseur des gènes de biosynthèse de NAD	Ara+1	12
<i>hokB-sokB</i>		Homologue système de maintien de plasmide	Ara+1	5
<i>pbpA-rodA</i>		Synthèse du peptidoglycane	Ara+1	6
<i>rbs</i>		Catabolisme du ribose	Ara-1, Ara+1	12
<i>spoT</i>	Analyse du transcriptome et du protéome	Réponse stringente, synthèse et dégradation de (p)ppGpp	Ara-1	8
<i>malT</i>		Régulateur transcriptionnel de l'opéron maltose	Ara-1, Ara+1	8

**Tableau 2 : Résumé des mutations découvertes dans les clones évolués.** Dans ce tableau sont indiqués les méthodes par lesquelles ont été identifiées les mutations ainsi que les populations initiales dans lesquelles elles ont été mises en évidence, et le nombre de populations comportant les mutations.

protéines PBP2 et RodA, impliquées dans la biosynthèse de la paroi (voir section II.1.2) ainsi que le locus *hokB-sokB* homologue à un système de maintien de plasmide (Tableau 2) (Schneider *et al.*, 2000a). Les loci *nadR* (Ara+1), *pykF* (Ara-1) et *hokB-sokB* (Ara+1) sont mutés par transpositions d'*IS150* à l'intérieur des séquences codantes, aboutissant probablement à l'inactivation de ces gènes. L'opéron *pbpA-rodA* est muté dans la population Ara+1 par insertion d'une séquence *IS150* 11pb en amont du promoteur, provoquant probablement une dérégulation de l'expression de ces gènes. Dans le cas de l'opéron *rbs*, il s'agit d'une délétion provoquée par l'insertion d'une séquence *IS150* dans cet opéron suivie d'un événement de recombinaison homologue entre cette nouvelle copie et une copie d'*IS150* présente en amont de l'opéron (Cooper *et al.*, 2001).

L'opéron ribose est le seul locus muté de façon indépendante dans les deux populations analysées. Or, cela correspond au phénotype de perte de capacité des clones évolués à utiliser le ribose comme source de carbone, observé dans toutes les populations (Cooper et Lenski, 2000) (voir section V.2.3). L'opéron ribose a donc été étudié dans les 10 autres populations et s'est révélé être le siège de délétions dans toutes les populations. Dans tous les cas, ces délétions sont fixées au cours des 2000 premières générations (Cooper *et al.*, 2001) (Tableau 2) et sont dues au même type de mécanisme (transposition d'*IS150* suivie d'un événement de recombinaison homologue). Ces événements de transposition-recombinaison conduisent à une instabilité du locus *rbs*, dont le taux de mutation est 10 fois plus élevé que les autres loci du chromosome (Cooper *et al.*, 2001). L'avantage apporté par une délétion de l'opéron *rbs* a été mesuré par introduction de cette mutation dans le chromosome de la souche ancêtre et compétition contre l'ancêtre non muté. Ceci a permis de déterminer qu'une délétion de l'opéron *rbs* apporte un avantage de 1 à 2 % dans les conditions de l'évolution expérimentale (Cooper *et al.*, 2001). La combinaison de cet avantage et d'un taux de mutation important du locus pourrait expliquer que ces mutations soient fixées avant 2000 générations dans la totalité des 12 populations (Cooper *et al.*, 2001). Le bénéfice apporté par les mutations *rbs* permet également de confirmer la spécialisation écologique de ces populations par le mécanisme de pleiotropie antagoniste (section V.2.3).

Afin de déterminer le degré de parallélisme génétique de l'évolution, les gènes *pykF*, *nadR*, *hokB-sokB* et *pbpA-rodA* ont été séquencés dans les 12 populations. Comme pour l'opéron ribose, toutes les populations présentent des mutations dans *pykF* et *nadR*. Cinq populations comportent des mutations dans *hokB-sokB* et 6 populations dans *pbpA-rodA* (Woods *et al.*, 2006) (Tableau 2). Ce fort degré de parallélisme génétique est en fort contraste avec les résultats obtenus suite au séquençage de 36 gènes choisis au hasard dans les clones



**Figure 29 : Représentation de la protéine SpoT et localisation des mutations mises en évidence dans 8 des 12 populations issues de l'évolution expérimentale (d'après Cooper *et al.*, 2003).** La protéine SpoT (79 Kda, 702 acides aminés) est composée de deux domaines majeurs : un domaine N-terminal catalytique et un domaine C-terminal de régulation dont la fonction est inconnue. Le domaine N-terminal comporte une partie synthétase et une partie hydrolase de (p)ppGpp qui se chevauchent. Le domaine C-terminal comporte un motif TGS, probablement impliqué dans la liaison des nucléotides. Les huit mutations apparues dans les populations évoluées se situent soit dans le domaine de régulation soit au niveau du chevauchement. Les modifications d'acides aminés générées par les mutations sont indiquées sous le schéma. Les mutations étudiées au cours de ce travail sont indiquées en rouge.

évolués isolés des 12 populations (Lenski *et al.*, 2003). Seules 10 mutations ont été mises en évidence, toutes présentes au sein des 4 populations qui ont évolué en phénotype mutateur suite à des mutations dans des gènes de réparation de l'ADN (Sniegowski *et al.*, 1997 ; Shaver *et al.*, 2002). De plus chaque mutation n'a été observée que dans une seule population (Lenski *et al.*, 2003). Cependant, à l'exception des mutations touchant l'opéron ribose, il n'existe pas de preuve expérimentale que les mutations identifiées soient bénéfiques. Plusieurs tests statistiques ont été effectués afin de déterminer si ces mutations sont le résultat de la sélection naturelle, en comparant les résultats obtenus pour les 4 gènes candidats (*nadR*, *pykF*, *pbpA-rodA*, *hokB-sokB*) et les gènes choisis au hasard (Woods *et al.*, 2006). D'une part, le taux de mutations par substitution touchant les gènes candidats est plus élevé que celui des gènes choisis au hasard. D'autre part, les gènes candidats présentent une plus grande proportion de mutations non synonymes que les gènes choisis au hasard. Enfin, si les mutations étudiées étaient neutres, les gènes candidats subiraient plus de substitutions chez les populations mutatrices que non mutatrices. Or la distribution des mutations au sein de ces gènes est uniforme entre les deux types de populations. Bien qu'aucune preuve expérimentale n'existe, tous ces tests tendent à démontrer que ces mutations seraient bien dues à la sélection naturelle et pourraient conférer un avantage sélectif au cours de l'évolution expérimentale (Woods *et al.*, 2006).

#### **V.4.2. Analyses moléculaires des modifications phénotypiques parallèles**

La comparaison des profils globaux d'expression des gènes (transcription et protéines) de deux clones évolués par rapport à l'ancêtre a révélé un degré exceptionnel de parallélisme phénotypique (section V.2.4). Une analyse plus détaillée des gènes dont l'expression est modifiée de façon parallèle a révélé que la moitié sont connus pour être régulés par (p)ppGpp, la molécule effectrice de la réponse stringente (Cashel *et al.*, 1996) (voir section III). Le séquençage des gènes *relA* et *spoT* a révélé une mutation du gène *spoT* dans la population Ara-1 (Cooper *et al.*, 2003). Le gain de fitness apporté par cette mutation a été mesuré par des expériences de compétition entre la souche ancêtre dans laquelle a été introduite la mutation et la souche ancêtre sauvage. Cette mutation apporte un avantage environ égal à 10%, ce qui est considérable (Cooper *et al.*, 2003). Le gène *spoT* a ensuite été séquencé dans les 12 populations évoluées et des mutations ont été découvertes dans huit populations, démontrant une fois de plus une évolution génétique parallèle (Fig.29).

Un autre point commun révélé par la comparaison des profils transcriptionnels et protéiques consiste en une forte diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation du maltose dans les deux populations analysées (Pelosi *et al.*, 2006). Le séquençage du gène *malT*, codant l'activateur de ces gènes, a révélé une mutation dans chacune des 2 populations, conduisant à la perte de capacité à utiliser le maltose chez les clones évolués (Pelosi *et al.*, 2006). Le séquençage de *malT* dans les clones évolués isolés des 12 populations a révélé la présence de mutations dans 8 populations, induisant la diminution parallèle de la capacité à utiliser le maltose dans la majorité des populations (Pelosi *et al.*, 2006).

Ainsi, le parallélisme phénotypique observé dans ces populations s'explique par un fort degré de parallélisme au niveau génétique, les mêmes gènes étant les cibles de la sélection naturelle dans la majorité des 12 populations. Il est cependant important de noter que, bien que les mêmes gènes soient affectés, les allèles mutants sont différents dans les différentes populations.

#### **V.4.3. Objectifs**

Un fort degré de parallélisme phénotypique et génétique est observé au sein des 12 populations au cours de l'évolution expérimentale. La sélection naturelle cible les mêmes gènes dans la majorité des 12 populations, mais les allèles mutants sont différents d'une population à l'autre. De plus, les mutations bénéfiques qui ont été mises en évidence, notamment la mutation touchant le gène *spoT* dans la population Ara-1, n'ont bien souvent été analysées que dans une seule population. Les effets moléculaires des mutations ont été peu étudiés, si bien que nous ne savons pas si le parallélisme génétique se répercute au niveau moléculaire. Il serait donc intéressant d'étudier les effets phénotypiques et moléculaires des mutations apparues de façon parallèle dans le même gène dans différentes populations au cours de l'évolution.

Malgré la démonstration de l'avantage apporté par certaines mutations (*rbs*, *malT*, *spoT*), la somme de leurs effets bénéfiques est loin d'atteindre le gain de fitness de 70% observé à 20 000 générations (Cooper et Lenski, 2000). Il est donc nécessaire d'analyser les effets des autres mutations identifiées et de détecter de nouvelles mutations participant à l'amélioration du fitness des bactéries.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce double objectif :

- caractériser au niveau moléculaire le parallélisme de l'évolution par l'étude de différentes mutations affectant les mêmes gènes dans plusieurs populations
- mettre en évidence de nouvelles mutations bénéfiques.

Dans le cadre du premier objectif et afin d'analyser les bases moléculaires et génétiques de l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude de mutations apparues dans le gène *spoT*, mises en évidence au sein de 8 populations sur 12 (Résultats chapitre II). Trois de ces mutations ont été analysées et ciblent le domaine C-terminal de SpoT dont la fonction est inconnue. Ces études pourraient donc permettre d'attribuer une fonction à ce domaine.

Dans le cadre du second objectif, deux études ont été réalisées. D'une part, nous avons choisi d'analyser les effets des mutations touchant l'opéron *pbpA-rodA*, détectées par les analyses de profils d'IS (Résultats chapitre III). Ces mutations n'ont jusqu'à présent pas fait l'objet d'études approfondies, même si des analyses statistiques suggèrent leur rôle dans l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale (Woods *et al.*, 2006). Cet opéron code les protéines PBP2 et RodA affectant la biosynthèse de la paroi et la morphologie cellulaire. Or la morphologie des cellules est la cible de changements au cours des transitions nutritionnelles (voir section II.1.2) et est modifiée au cours de l'évolution (voir section V.2.2). Nous avons donc cherché à définir l'impact de mutations de cet opéron sur l'adaptation des bactéries, aux niveaux phénotypique et moléculaire.

D'autre part, il serait intéressant d'identifier d'autres mutations bénéfiques impliquées dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. Hormis la réponse stringente, affectée au cours de l'évolution, un autre réseau de régulation globale permet l'adaptation des bactéries aux transitions nutritionnelles : il s'agit de la topologie de l'ADN (chapitre IV). Ainsi, l'analyse de l'évolution de ce réseau, aux niveaux phénotypique et génétique, pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles mutations bénéfiques (Résultats chapitre IV).

Les analyses phénotypiques, génétiques et moléculaires des mutations identifiées nécessitent leur isolement dans le contexte génétique du clone ancêtre. Ceci permet d'étudier spécifiquement leur effet sur le fitness ou tout autre phénotype. Nous avons donc développé un système de construction de souches isogéniques basé sur un plasmide suicide que je vais brièvement décrire dans une première partie, avant de passer à l'étude des différentes mutations.



## **I. Etude de mutations par construction de souches isogéniques au moyen de plasmides-suicide**

---

Ce travail a fait l'objet de la publication ci-jointe intitulée « Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria » (Philippe N., Alcaraz J.P., Coursange E., Donnenberg M., Geiselman J. and Schneider D, 2004, Plasmid 51 : 246-255).

Au cours de l'évolution expérimentale sont apparues un certain nombre de mutations permettant l'adaptation des populations aux conditions de l'évolution. L'impact de chaque mutation sur le fitness et d'autres phénotypes ne peut pas être analysé de manière précise dans le contexte génétique des clones évolués. En effet, dans ces contextes les autres mutations apparues peuvent interférer avec la mutation dont les effets sont analysés. Ainsi, il est nécessaire d'isoler les mutations d'intérêt, c'est-à-dire de les introduire dans le génome du clone ancêtre. Ceci permet d'obtenir des souches isogéniques sauf pour les allèles étudiés. Les modifications phénotypiques observées entre les souches portant les allèles ancestraux et évolués des gènes étudiés peuvent alors être spécifiquement attribuées aux mutations découvertes initialement dans le génome de clones évolués.

De nombreux outils permettant d'introduire des mutations par recombinaison homologue dans les chromosomes bactériens existent. Il est possible d'échanger des allèles par transformation des cellules avec de l'ADN linéaire obtenu par PCR (Murphy *et al.*, 2000). Toutefois, chez *E. coli* l'ADN linéaire est rapidement dégradé par l'exonucléase RecBCD. Des techniques basées sur la recombinaison médiée par le phage  $\lambda$  ont également été développées (Yu *et al.*, 2000). Le système du bactériophage  $\lambda$  Red (*exo*, *gam*, *bet*) permet une recombinaison efficace de l'ADN linéaire avec le chromosome en utilisant des homologies d'ADN très courtes et dans tous les contextes génétiques. Néanmoins, cette stratégie implique l'introduction d'une cassette de résistance à un antibiotique. Celle-ci peut être éliminée par un système faisant intervenir de petites séquences reconnues par des enzymes de type flippase recombinase. Cependant, ceci laisse tout de même une cicatrice sur le chromosome, ce qui peut poser des problèmes de recombinaison en cas d'introduction de mutations multiples (Martinez-Morales *et al.*, 1999). Afin d'éviter ce genre de problèmes, il est possible d'utiliser des plasmides-suicide qui permettent d'introduire tous types de mutations (ponctuelles, délétions, insertions) dans n'importe quel contexte génétique.

Pour introduire les allèles évolués d'intérêt dans le génome ancestral, nous avons choisi d'utiliser cette méthode. Cette stratégie permet d'échanger des allèles par recombinaison homologue en deux étapes sans laisser de cicatrice ni de marqueur de résistance sur le chromosome. Il est ainsi possible de combiner plusieurs mutations dans la même souche. La première étape consiste à sélectionner l'intégration du plasmide-suicide dans le chromosome de la souche receveuse par un événement de recombinaison homologue. Celui-ci se produit entre les deux allèles du gène étudié, l'un présent sur le chromosome, l'autre cloné sur le plasmide. Le plasmide-suicide possède un marqueur de résistance à un antibiotique et est incapable de se répliquer dans la souche hôte dans certaines conditions. Deux types de plasmides sont en général utilisés. Les plasmides de type pKO3 portent une origine de répllication thermosensible, qui empêche toute répllication à 42°C (Link *et al.*, 1997). D'autres plasmides, type pCVD442, portent l'origine de répllication du plasmide R6K, ne permettant leur répllication qu'en présence de la protéine  $\pi$ , produit du gène *pir* (Donnenberg et Kaper, 1991). L'intégration du plasmide dans le chromosome au locus du gène étudié est ainsi sélectionnée en conditions restrictives (42°C ou hôte *pir*<sup>-</sup>) en présence de l'antibiotique. Ceci résulte en une duplication du gène d'intérêt, une copie correspondant à l'allèle mutant porté par le plasmide, l'autre copie correspondant à l'allèle chromosomique. L'étape suivante consiste à sélectionner les cellules ayant perdu le plasmide par un deuxième événement de recombinaison homologue entre les deux copies du gène étudié. Cette sélection est effectuée grâce à un marqueur de contre-sélection porté par le plasmide et qui code une protéine toxique pour les cellules dans certaines conditions (Reyrat *et al.*, 1998). Nous avons utilisé le marqueur *sacB* qui code la lévane saccharase, létale pour les bactéries Gram- en présence de sucrose (Reyrat *et al.*, 1998). Les bactéries ayant intégré le plasmide sont donc cultivées en présence de sucrose, ce qui permet de sélectionner les cellules ayant perdu le plasmide, alors résistantes au sucrose. L'excision du plasmide peut conduire soit à la restauration de l'allèle d'origine, soit à l'intégration de l'allèle d'intérêt. Les clones résistants au sucrose peuvent alors être analysés par PCR, la taille du produit permettant de distinguer l'allèle de départ d'un allèle muté portant une délétion ou une insertion. Lorsque l'allèle d'intérêt comporte une mutation ponctuelle générant ou éliminant un site de restriction, les clones sont analysés par PCR suivie d'une digestion enzymatique. Dans le cas contraire, un séquençage permet de cribler les clones sélectionnés.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé les plasmides-suicide pKO3 (*ori* Ts, *cm*<sup>R</sup>, *sacB*) et pCVD442 (*ori* R6K, *amp*<sup>R</sup>, *sacB*). Cependant, l'utilisation de pCVD442 a entraîné des difficultés liées à l'intégration non spécifique de ce plasmide. Le séquençage de

pCVD442 a révélé qu'il portait une partie d'*IS1*. Ceci pouvait donc provoquer la recombinaison homologue du plasmide avec les copies d'*IS1* présentes sur le chromosome d'*E. coli*. Une vingtaine de copies d'*IS1* sont effectivement recensées chez *E. coli* B (Schneider et al., 2002). Cette partie du plasmide a été éliminée afin d'éviter les recombinaisons au niveau d'*IS1* et de permettre son intégration spécifique dans le chromosome au niveau du gène d'intérêt. Le gène de résistance à l'ampicilline a également été remplacé par le gène de résistance au chloramphénicol, éliminant ainsi l'apparition de colonies satellites dues à la diffusion de  $\beta$ -lactamase dans le milieu de culture. Le plasmide suicide amélioré a été rebaptisé pDS132. Ce nouveau plasmide a déjà permis la modification et l'étude de nombreux allèles et sa mise au point a fait l'objet de la publication ci-jointe. Une cinquantaine de laboratoires se sont révélés intéressés par l'utilisation de pDS132. Une quinzaine d'entre eux nous ont également rapporté des problèmes d'insertion aléatoire du plasmide pCDV442.

Très récemment, une nouvelle méthode appelée « gene gorging » a été mise au point (Herring *et al.*, 2003). L'allèle d'intérêt est cloné sur un plasmide qui est linéarisé *in vivo* à l'intérieur des cellules, ce qui fournit un substrat d'ADN linéaire pour le système de recombinaison par  $\lambda$  Red (Herring *et al.*, 2003). Cette technique permet d'échanger des allèles grâce à une double recombinaison homologue en une seule étape. Ceci permet d'éviter d'interrompre et inactiver le gène cible par introduction d'une séquence ADN étrangère, type plasmide suicide. Il est alors possible d'introduire des mutations ponctuelles dans des gènes essentiels à la viabilité cellulaire. Cette méthode ayant fait l'objet d'une publication au cours de ma thèse, nous avons préféré continuer à utiliser la technique du plasmide suicide.

# Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria

Nadège Philippe,<sup>a</sup> Jean-Pierre Alcaraz,<sup>b</sup> Evelyne Coursange,<sup>a</sup>  
Johannes Geiselmann,<sup>a</sup> and Dominique Schneider<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, CNRS UMR 5163, Université Joseph FOURIER,  
460, rue de la piscine, 38400 Saint Martin d'Heres, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire Génétique Moléculaire des Plantes, CNRS UMR 5575, Université Joseph FOURIER,  
460, rue de la piscine, 38400 Saint Martin d'Heres, France*

Received 22 December 2003, revised 16 February 2004

## Abstract

Allelic exchange experiments allow investigation of the functions of many unknown genes identified during the sequencing of entire genomes. Isogenic strains differing by only specific mutations can be constructed. Among other tools, suicide plasmids are widely used for this task. They present many advantages because they leave no scars on the chromosome, and therefore allow combining several mutations in the same genetic background. While using the previously described pCVD442 suicide plasmid [Infect. Immun. 59 (1991) 4310], we found untargeted recombination events due to the presence of an *IS1* element on this plasmid. The plasmid was therefore improved by removal of the *IS1* element. We also replaced the *bla* gene of pCVD442, conferring ampicillin resistance, by the *cat* gene conferring chloramphenicol resistance, leading to the new suicide plasmid pDS132. The plasmid was entirely sequenced. We demonstrate that this new vector can be easily used to introduce various types of mutations into different genetics backgrounds: removal of *IS* elements, introduction of point mutations or deletions. It can be introduced into bacterial strains by either transformation or conjugation.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Gene inactivation; Recombination; *IS* elements; Isogenic strains

## 1. Introduction

The relationship between phenotypes and corresponding genotypes is often obtained by analyses of a mutant phenotype and subsequent

characterisation of the gene. Alternatively, reverse genetic analysis consists in constructing mutations in specific target genes and investigating the phenotype of the generated mutant strains. Random mutations can be created by chemical or transposon mutagenesis, whereas specific mutations are usually generated by homologous recombination on the chromosome of many bacterial strains. This technique reduces the need for screening

\* Corresponding author. Fax: +33-4-76-63-56-63.

E-mail address: [dominique.schneider@ujf-grenoble.fr](mailto:dominique.schneider@ujf-grenoble.fr) (D. Schneider).

procedures, especially for genes with no selectable phenotype.

The genome of more than 100 bacterial strains is now completely sequenced. Open reading frames represent about 90% of bacterial chromosomes, but the function of 40–60% of the genes remains unknown. Reverse genetic analysis and construction of specific mutations through allelic exchange has to be used to decipher the function of these genes. Moreover, some genes present redundant functions and several mutations therefore have to be combined in the chromosome. This can be achieved by constructing “clean” mutations without any resistance markers or scars, which also avoids subsequent recombination due to new homologies in the chromosome.

A number of tools have been described for introducing mutations in bacterial chromosomes (Martinez-Morales et al., 1999; Murphy et al., 2000; Yu et al., 2000). To avoid antibiotic resistance markers or scars in the chromosome, the most useful tools are suicide vectors, which also allow combination of multiple mutations. These systems involve a two-step procedure with plasmid integration within the target sequence by homologous recombination, followed by its excision via a second cross-over event, resulting in allelic exchange. Two types of suicide plasmids have been engineered: temperature-sensitive plasmids like pSC101 (Cornet et al., 1994), pKO3 and their derivatives (Link et al., 1997), and plasmids carrying the replication origin of R6K, such as pCVD441 and its derivatives (Donnenberg and Kaper, 1991). The replication of the first type of plasmids is possible only at the permissive temperature, while the second type of plasmids are able to replicate only in strains producing the  $\pi$  protein, the product of the *pir* gene. Integration of the plasmids into the chromosome is selected by an antibiotic resistance marker, either at the restrictive temperature or in a *pir*<sup>−</sup> background. Excision of the integrated plasmid for allelic exchange is selected with counter-selectable markers: if the plasmid is still integrated in the chromosome, the cell will die in the presence of the counter-selective compound (Reyrat et al., 1998). There are three major counter-selectable determinants that have been used to construct

mutant strains in many bacteria: (i) *The fusaric acid-sensitivity system*: the counter-selectable marker is encoded by *tetAR*, which results in tetracycline resistance but in fusaric or quinalic acids hypersensitivity. Cells that have lost *tetAR* can therefore be selected through their increased resistance to fusaric acid (Maloy and Nunn, 1981). However, this system often generates deletions with polar effects on downstream genes. (ii) *The streptomycin-sensitivity system*: the wild-type *rpsL* gene encodes the ribosomal protein S12, the target of streptomycin. Some mutations in *rpsL* provide streptomycin resistance. The wild-type *rpsL* allele is used on a suicide plasmid containing the sequence to introduce into the chromosome of an *rpsL*<sup>−</sup> streptomycin-resistant strain. Resistance being recessive in a merodiploid strain, excision of the suicide plasmid can be selected through the loss of the *rpsL*<sup>+</sup> allele and therefore by streptomycin resistance. This system therefore involves the selection of spontaneous streptomycin-resistant clones (Dean, 1981). (iii) *The sucrose-sensitivity system*: the *Bacillus subtilis* *sacB* gene encodes levane saccharase, which is lethal in most gram-negative bacteria in the presence of sucrose (Gay et al., 1983). Plasmid excision in the cells can therefore be selected by growth in a sucrose-containing medium. This system is widely used in most common suicide plasmids.

We describe here the construction and use of a derivative of the well-described suicide plasmid pCVD442 (Donnenberg and Kaper, 1991), which carries *R6K ori*, the replication origin of plasmid R6K, the *mob* (plasmid mobilisation region) and *bla* (ampicillin resistance conferring gene) regions of the suicide vector pGP704 (Miller and Mekalanos, 1988), the *sacB* gene of *B. subtilis*, and five unique restriction endonuclease sites for cloning. While using pCVD442 we were confronted with problems of untargeted integration in the chromosome and discovered that they were due to the presence of part of an *IS1* element on the plasmid. This element therefore constitutes a good substrate for homologous recombination in the chromosome in a wide variety of bacteria. We have modified pCVD442 by removal of this insertion sequence. We also replaced *bla* by the *cat* gene conferring

chloramphenicol resistance. The new suicide plasmid, called pDS132, was sequenced.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains, plasmids, and media

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1.

Strains were grown routinely in rich liquid or solid (12 g/L agar) Luria Broth medium (LB)<sup>1</sup> (Sambrook et al., 1989). The media can be supplemented with kanamycin (50 µg/mL), chloramphenicol (30 µg/mL) or streptomycin (25 µg/mL). Solid LB medium with 5% sucrose and without NaCl was used to select plasmid excision from the chromosome, during the gene allelic exchange experiments. Omission of NaCl from this medium was shown previously to improve the sucrose counterselection in *Escherichia coli* (Blomfield et al., 1991).

### 2.2. Electrotransformation

Cells were grown in LB until mid-log phase ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.5$ ). After collection by centrifugation, cells were washed twice with cold sterile water and once with cold sterile 10% glycerol. Electrocompetent cells were then resuspended into 10% glycerol at  $3.5 \times 10^{10}$  CFU/mL, and aliquoted in 40 µL samples, which were stored at  $-80^\circ\text{C}$ . For electrotransformation, 50 ng of the desired plasmid were mixed with a sample of electrocompetent cells. The mixture was submitted to 2500 V for 4.5 ms, with a resistance of 200 Ω and a capacitance of 25 µF using a Biorad electroporator. Cells were immediately resuspended in 1 mL LB and grown for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , before plating on selective growth medium.

<sup>1</sup> Abbreviations used: Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistant; Cam<sup>R</sup>, chloramphenicol resistant; Cam<sup>S</sup>, chloramphenicol sensitive; CFU, colony forming unit; IPTG, isopropyl-thio-β-D-galactoside; LB, Luria Broth medium; PCR, polymerase chain reaction; RFLP, restriction fragment length polymorphism; Str<sup>R</sup>, streptomycin resistant; Suc<sup>R</sup>, sucrose resistant; Xgal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside.

### 2.3. Conjugation

Donor and recipient strains were grown in LB until late log phase ( $OD_{600\text{ nm}} = 0.8$ ). Cells were then mixed at an equal ratio and spotted onto a nylon filter on a LB plate. After 6 h of conjugation at  $37^\circ\text{C}$ , cells were recovered by washing the filters with 10 mM MgSO<sub>4</sub> and plated on the appropriate selective medium to eliminate the donor strain and to select for plasmid integration into the chromosome. SM10 *λpir* was used as the donor strain to allow efficient replication of the *R6K ori*-based suicide plasmid. The recipient strain does not contain the *pir* gene, therefore preventing relication of the plasmid.

### 2.4. Construction of pDS132

The construction of pDS132 is summarised in Fig. 1. pDS132 is derived from pCVD442 plasmid (Donnenberg and Kaper, 1991).

pCVD442 contains 500 bp of an *IS1* element between the *sacB* and *bla* genes, which can generate undesired recombination events. Hence, there are, for example, 20 copies of *IS1* in the *E. coli* B chromosome (Papadopoulos et al., 1999) and six in the *E. coli* W3110 chromosome (Naas et al., 1994). This may therefore interfere in knock-out experiments of specific genes using pCVD442 as a suicide plasmid. To overcome this problem, this *IS1* sequence together with the *bla* gene were removed by digesting pCVD442 with *NdeI* and *AspI* (Fig. 1). The large fragment was blunt-ended with the Klenow fragment of DNA polymerase I and ligated to the *cat* gene, obtained after a *SmaI* digestion of pCamI, leading to pDS132, which was subsequently sequenced. The *cat* gene confers chloramphenicol resistance and replaces *bla* in the selection of the plasmid integration event. The pDS132 nucleotide sequence has been deposited in the GenBank database and has been assigned the Accession No. AY489048.

The pCamI plasmid, from which the *cat* gene was excised, was obtained by PCR amplification from plasmid pBC with the two oligonucleotides Cm top (CGG GAT CCC GCC CGG GAA TTA CGC CCC GCC C) and Cm bottom (CGG GAT CCC GCC CGG GCA GGA GCT AAG GAA

Table 1  
Strains and plasmids used in this study

	Description	Reference
<i>Strains</i>		
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir	<i>supE4</i> <i>AlacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> $\lambda$ pir	Simon et al. (1983)
<i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir	<i>thi</i> <i>thr</i> <i>leu</i> <i>tonA</i> <i>lacY</i> <i>supE</i> <i>recA::RP4-2-Tc::Mu</i> Km $\lambda$ pir	Donnenberg and Kaper (1991)
<i>E. coli</i> REL606	B Bc251 T6 <sup>R</sup> Str <sup>R</sup> <i>rmIII</i> Ara <sup>-</sup>	Lederberg (1966) and Schneider et al. (2002)
<i>E. coli</i> S1	A small-cell clone isolated from REL606 during a laboratory evolution experiment. <i>b2875::IS150</i> , <i>menC::IS186</i>	Rozen and Lenski (2000)
<i>Plasmid</i>		
pCVD442	<i>R6K</i> ori, <i>mobRP4</i> , <i>bla</i> , <i>sacB</i>	Donnenberg and Kaper (1991)
pCR-II-TOPO	<i>ColE1</i> ori, <i>Plac</i> MCS <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>f1</i> ori, Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pCamI	<i>cat</i> gene cloned into pCR-II-TOPO	This work
pBC	<i>pUC</i> ori, <i>Plac</i> MCS <i>lacZ</i> $\alpha$ , <i>f1</i> ori, Cam <sup>R</sup>	Stratagene
pDS132	Derived from pCVD442, without <i>IS1</i> sequences. <i>bla</i> gene replaced by the <i>cat</i> gene	This work
pDS101	<i>menC</i> cloned into pDS132	This work
pDS102	<i>AmenC</i> cloned into pDS132	This work
pDS107	<i>b2875</i> cloned into pDS132	This work
pDS109	<i>Ab2875</i> cloned into pDS132	This work

GCT A), each containing a *SmaI* site. The PCR product was then cloned in pCRII-TOPO, using the pCRII-TOPO kit (Invitrogen), resulting in pCamI. The *cat* gene can subsequently be excised as a 600-bp *SmaI* fragment.

### 2.5. Allelic exchange

The cloning steps of the desired gene alleles into pDS132 were performed in *E. coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ pir or SM10  $\lambda$ pir strains to allow replication of the plasmid. The recombinant plasmids were then purified and introduced in the appropriate strains in either of two ways: either by transformation of electrocompetent cells of the chosen strain, or by conjugative transfer from *E. coli* SM10  $\lambda$ pir, which carries the *tra* genes of the RP4 plasmid, into the Str<sup>R</sup> target strain.

The first step of allelic exchange was selection of plasmid integration into the recipient chromosome (which does not carry the *pir* gene) by plating cells on chloramphenicol-LB plates. For conjugation experiments, the donor strain SM10  $\lambda$ pir was eliminated by adding streptomycin in the medium. After overnight growth at 37 °C, one colony was picked, diluted in 10 mM MgSO<sub>4</sub>, and serial dilu-

tions were plated on LB agar plates with 5% sucrose and without NaCl. This plating step allowed selection of plasmid excision from the chromosome by a second cross-over. After overnight incubation at 37 °C, 100 clones were streaked on chloramphenicol-containing LB agar plates and on LB agar with 5% sucrose and without NaCl. Suc<sup>R</sup> Cam<sup>S</sup> clones were stored in a glycerol suspension at -80 °C. Since allelic exchange depends on the localisation of the second cross-over event, we screened several clones by PCR or Southern blot (Southern, 1975) in order to identify those carrying the desired allele. Labelling of the probes and hybridisation experiments were performed using the DIG labelling kit of Roche, according to their recommendations.

## 3. Results and discussion

### 3.1. pCVD442 carries a fragment of an *IS1* element

Untargeted chromosomal insertions, using pCVD442 as a suicide plasmid, were detected while trying to inactivate the *lac* operon in the REL606 *E. coli* strain. An internal fragment of the

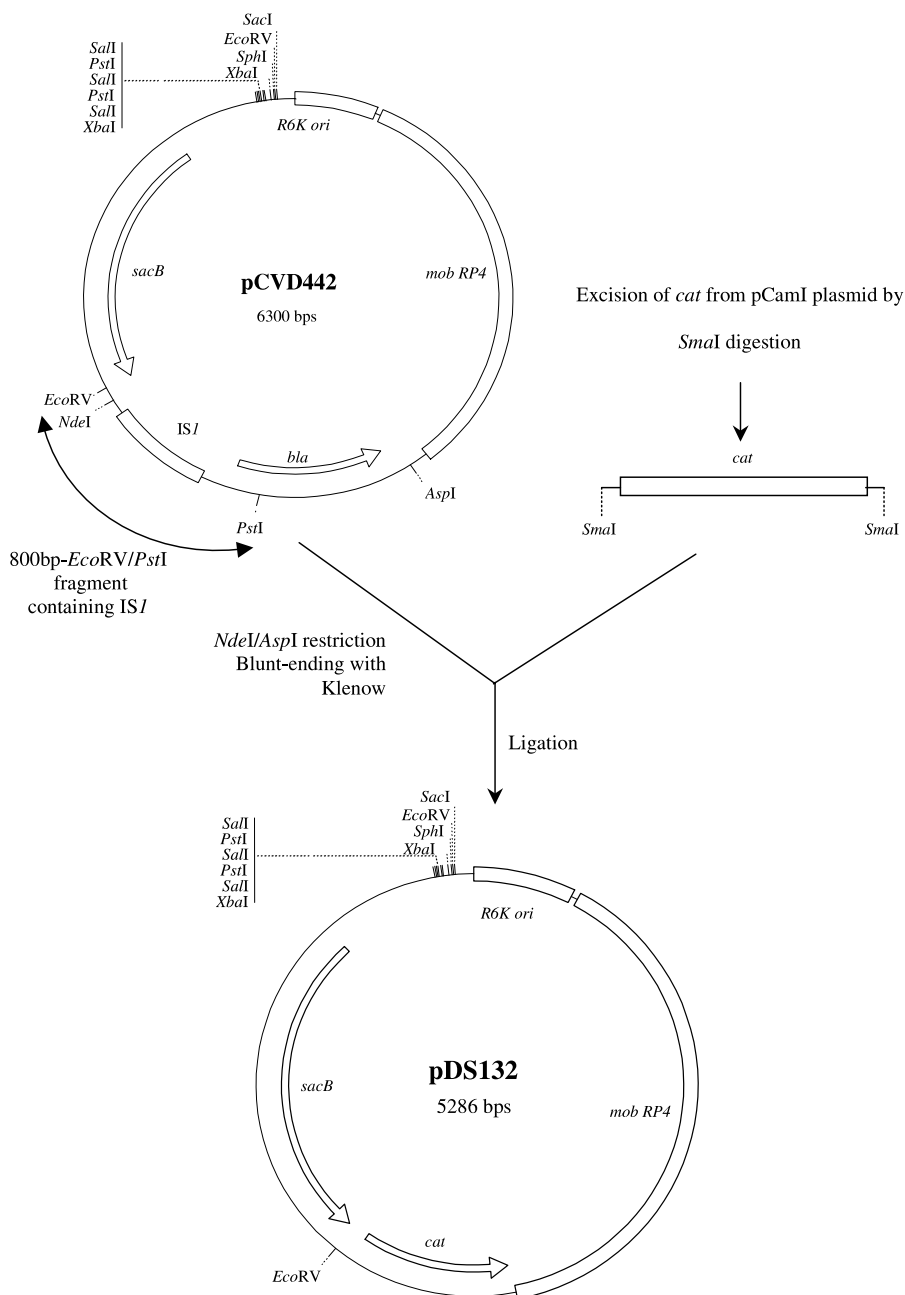


Fig. 1. Construction of pDS132. The pDS132 plasmid is derived from pCVD442 (Donnenberg and Kaper, 1991), which contains the *bla* gene conferring ampicillin resistance, the *mob* region of the RP4 plasmid (mobilisation), the *sacB* gene encoding levane saccharase, a multiple cloning site, and the *R6K ori* region from plasmid R6K. pCVD442 also carries 500 bp of an *IS1* element between the *sacB* and *bla* genes, which may generate undesired recombination events with resident *IS1* elements in the recipient strains. To overcome this problem, this *IS1* sequence, together with the *bla* gene, was replaced by the *cat* gene obtained from plasmid pCamI after digestion with *SmaI* (see Section 2.4). The *cat* gene confers chloramphenicol resistance. This new vector was called pDS132. The details of the construction are given in Section 2.4. The size of the *EcoRV*/*PstI* fragment of pCVD442 carrying the fragment of *IS1* is shown.



*lac* operon was cloned into pCVD442 and the recombinant plasmid was used to transform REL606. The chromosomal insertion of the plasmid by homologous recombination in the *lac* operon was selected on LB plates with ampicillin. One hundred ampicillin-resistant individual colonies were further streaked onto LB plates containing ampicillin, Xgal and IPTG. We expected almost all of the clones to be Amp<sup>R</sup> and white (i.e., Lac<sup>-</sup>). This was, however, not the case: 90% of the Amp<sup>R</sup> clones remained blue (Lac<sup>+</sup>). The presence of the *lac* wild-type allele was confirmed in these clones by Southern blot of their genomic DNA and hybridisation using a fragment of the *lac* operon as a probe (data not shown). To confirm the presence of pCVD442 in the chromosome of these clones, we used the suicide plasmid as a probe against the genomic DNA of these clones cut with *EcoRV*: about 20 fragments were detected. The hybridisation patterns were similar to the ones obtained with *IS1* as a probe against genomic DNA of REL606 (Papadopoulos et al., 1999). Hybridisation experiments using *IS1* as a probe indeed revealed the presence of an *IS1* element within the 800-bp *EcoRV/PstI* fragment of pCVD442 (data not shown). Sequencing of the *EcoRV/PstI* fragment revealed the presence of a part (500 bp) of an *IS1* (not shown). In order to conserve the use of pCVD442 as a suicide plasmid for gene allelic exchange experiments, we removed this *IS1* fragment. We also replaced the *bla* gene, conferring ampicillin resistance by *cat*, conferring chloramphenicol resistance (Fig. 1, see Section 2.4). The new plasmid was called pDS132 and was subsequently tested for different kinds of allelic exchanges.

### 3.2. Removal of IS elements

As a first type of allelic exchange, we removed IS elements from their insertion sites within defined genes. Two IS-containing genes were chosen: *menC*, encoding *o*-succinyl benzoate synthase involved in menaquinone biosynthesis (Meganathan, 1996), and *b2875*, a gene with unknown function (Blattner et al., 1997). An *IS150* insertion within *b2875* and an *IS186* insertion within *menC* (unpublished data) had been characterised in clones

called S, isolated from a long-term experimental evolution using *E. coli* (Cooper and Lenski, 2000; Lenski et al., 1991; Rozen and Lenski, 2000).

#### 3.2.1. Cloning of *b2875* and *menC* wt and deletion alleles into pDS132

The *b2875* gene was isolated from the genomic DNA of the reference strain REL606 as an *EcoRI/HindIII* fragment of 7221 bp, which was cloned into the pBC vector resulting in plasmid pDS103 (Fig. 2A). (The *IS150* element is located at position 4405 in this fragment in the S clones). This plasmid was then digested by *Asp700* and *SrfI*, generating three fragments: one 4270-bp *Asp700/SrfI* fragment containing the 5' side of the 7221-bp *EcoRI/HindIII* fragment, one 4821-bp *Asp700* fragment containing the 3' side of that same fragment, and a 1529-bp *SrfI/Asp700* fragment localised in the middle of the fragment. (The *IS150* insertion site in the S clones is located within this last 1529-bp *Asp700/SrfI* fragment.) The first two fragments were then religated, resulting in plasmid pDS106. This plasmid therefore carries an allele of *b2875* containing a deletion including the site where the *IS150* element is inserted in the S clones. An *AccI* digestion of pDS106 allowed the isolation of a 2391-bp *AccI* fragment containing the *b2875*-deletion allele with 896 and 1495 bp of adjacent sequences at the 5' and the 3' sides of the deletion, respectively. The 2391-bp *AccI* fragment was purified and the cohesive ends were filled-in with the Klenow fragment of DNA polymerase. The resulting fragment was subsequently cloned into pDS132 cut with *SalI* and blunt-ended, resulting in plasmid pDS109 (Fig. 2C). A similar strategy was used to clone the wt allele of *b2875* into pDS132: a 3920-bp *AccI* fragment containing the wt *b2875* allele, was obtained from plasmid pDS103. After filling-in the cohesive ends, this fragment was cloned into pDS132 cut with *SalI* and blunt-ended, resulting in plasmid pDS107 (Fig. 2B).

A similar strategy, described in Fig. 3, was used to clone the *menC* alleles into pDS132.

#### 3.2.2. Gene allele exchange experiments for *b2875* and *menC*

The four plasmids, pDS107, pDS109, pDS101, and pDS102 were used to replace the *b2875::IS150*

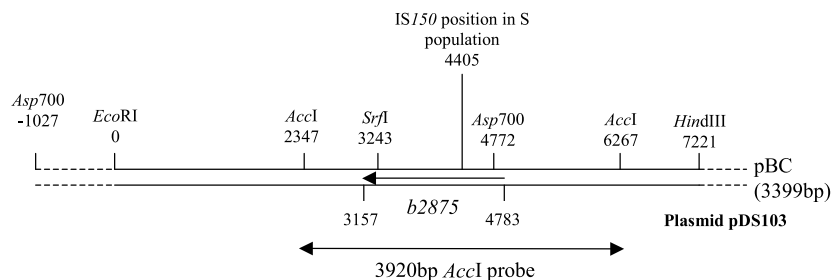
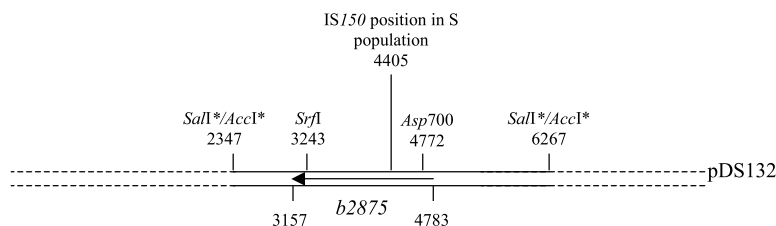
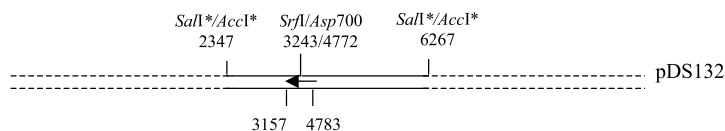
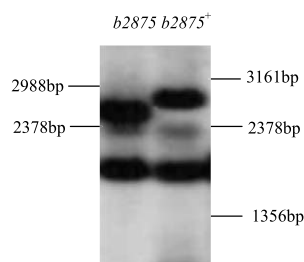
**(A) Cloning of the *b2875* chromosomal region into pBC****(B) Plasmid pDS107, bearing the *b2875* wild-type allele****(C) Plasmid pDS109, bearing the *b2875* deletion allele****(D) Hybridisation experiments**

Fig. 2. Construction of suicide plasmids pDS107 and pDS109, bearing the *b2875* wt and deletion allele respectively. (A) A 7221 bp *EcoRI/HindIII* fragment containing the *b2875* gene was cloned into pBC, leading to pDS103. Relevant restriction sites are shown. Coordinates are given with respect to the *EcoRI/HindIII* fragment. The *IS150* insertion site in the S clones is shown, as well as the direction of transcription of *b2875*. The 3920-bp *AccI* fragment used as a probe in hybridisation experiments is shown. The dashed lines represent the pBC vector. (B) Map of pDS107, the suicide plasmid carrying the *b2875* wild-type allele. It was obtained by *AccI* digestion of pDS106 (not shown) and filling-in of the ends of the 3920-bp fragment. This fragment was cloned into pDS132, cut with *SalI* and blunt-ended. The dashed lines represent the pDS132 vector. (The *AccI* and *SalI* sites with an asterisk were filled-in.) (C) Map of pDS109, the suicide plasmid carrying the *b2875* deletion allele. It was obtained by *Asp700/SrfI* digestion of plasmid pDS103 and subsequent ligation of a 4270-bp *Asp700/SrfI* fragment and a 4821-bp *Asp700* fragment, resulting in pDS106 (not shown). pDS106 was digested by *AccI* and the ends of the 2391-bp fragment were filled-in (shown with asterisks). This fragment was cloned into pDS132, cut with *SalI* and blunt-ended (shown with asterisks). The dashed lines represent the pDS132 vector. (D) The presence of the expected alleles in the different constructed strains was confirmed by hybridisation experiments using a 3920 bp *AccI* fragment of pDS103 as a probe (see A) with genomic DNA of isolated *Suc<sup>R</sup> Cam<sup>S</sup>* clones digested with *PvuII*. The expected sizes of the fragment are 3161, 2378, and 1356 bp for the wt *b2875* allele, and 2378 and 2988 bp for the deletion allele of *b2875*.

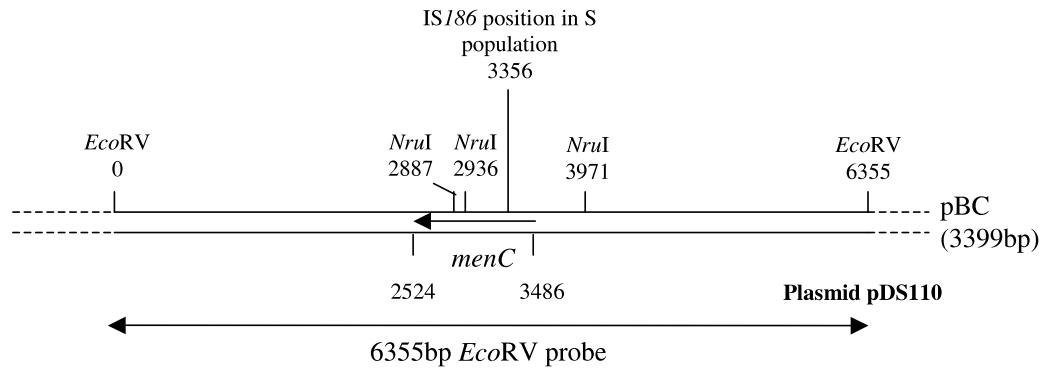
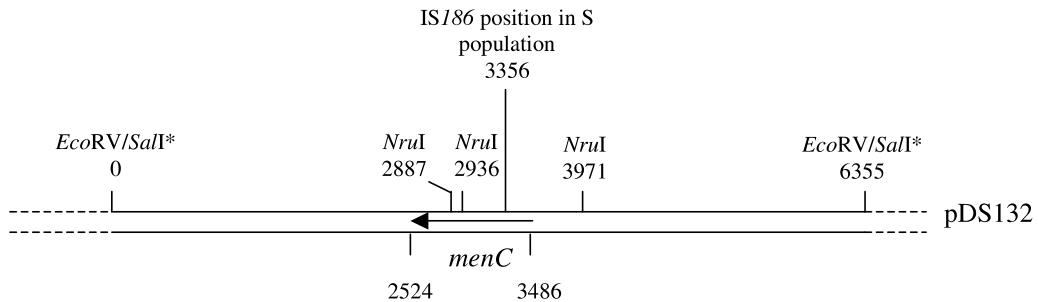
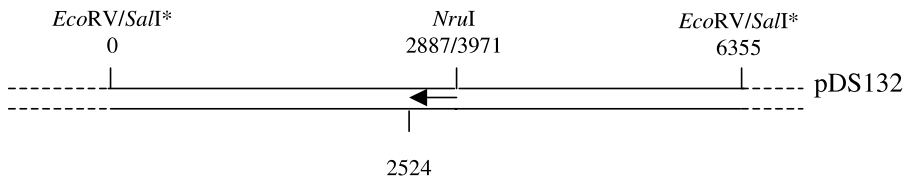
**(A) Cloning of the *menC* chromosomal region into pBC****(B) Plasmid pDS101, bearing the *menC* wild-type allele****(C) Plasmid pDS102, bearing the *menC* deletion allele**

Fig. 3. Construction of suicide plasmids pDS101 and pDS102, bearing the *menC* wild-type and deletion allele respectively. (A) A 6355 bp *EcoRV* fragment containing the *menC* gene (positions 3486 to 2524) was cloned into pBC, leading to pDS110. Relevant restriction sites are shown. Coordinates are given with respect to the *EcoRV* fragment. The *IS186* insertion site in the S clones is shown, as well as the direction of transcription of *menC*. The 6355-bp *EcoRV* fragment used as a probe in hybridisation experiments is shown. (B) Map of pDS101, the suicide plasmid carrying the *menC* wild-type allele. The plasmid was obtained by *EcoRV* digestion of pDS110 and cloning of the 6355-bp fragment into pDS132 cut with *SalI* and blunt-ended. (The *SalI* sites with an asterisk were blunt-ended.) (C) Map of pDS102, the suicide plasmid carrying the *menC* deletion allele. This plasmid was obtained by *NruI* digestion of plasmid pDS110 and subsequent religation of a 8700-bp fragment resulting in pDS111 (not shown). pDS111 was then digested by *EcoRV* and the 5271 bp fragment, containing a 1084 bp deletion allele of *menC*, was cloned into pDS132 cut with *SalI* and blunt-ended (shown with asterisks), generating pDS102.

and *menC::IS186* alleles in the S1 clone, by the wild-type and the deletion alleles. The pDS109 and pDS102 plasmids were also used to replace the wt *b2875* and *menC* alleles in the REL606 ancestor strain by the deletion alleles. The four plasmids were separately introduced into the S1 clone by conjugation with the SM10  $\lambda$ pir strain containing the corresponding suicide plasmid as a donor (see Section 2.3). (For replacement of the wt alleles, REL606 was used as a recipient.) Integration of the suicide plasmids into the chromosome was selected by plating the conjugation mixtures onto LB plates containing chloramphenicol and streptomycin. An integration frequency of about  $10^{-6}$  was obtained in all cases. Excision of the plasmids was then selected on LB plates with 5% sucrose and without NaCl, with an observed frequency of about  $10^{-2}$ . The presence of the expected alleles in the different constructed strains was confirmed by hybridisation experiments. A 3920-bp *AccI* fragment of pDS103 was used as a probe (Fig. 2A) with genomic DNA of 20 isolated Suc<sup>R</sup> Cam<sup>S</sup> clones digested with *PvuII* (Fig. 2D for an example) to detect *b2875* alleles. For *menC*, a 6355-bp *EcoRV* fragment of pDS110 was used as a probe with genomic DNA of 20 isolated Suc<sup>R</sup> Cam<sup>S</sup> clones digested with *PstI* (data not shown). About 50% of the studied clones contained the expected alleles. Among the 20 clones analysed in each case, no significant differences were observed for the ratio of the number of clones having incorporated the new allele to the number of clones with the original allele, as a function of the length of the adjacent sequences. For example, using pDS107 (adjacent sequences of 2058 and 1495 bp, respectively), 9 out of 20 analysed clones contained the new allele. Using pDS109 (adjacent sequences of 896 and 1495 bp, respectively), 7 out of 20 analysed clones contained the expected allele.

The plasmid pDS109 was introduced by conjugation into the REL606 strain carrying the *menC* deletion allele to add the *b2875* deletion. Clones carrying the two mutations were successfully obtained using the same method. The presence of both mutations was verified by hybridisation using the same probes as the ones described above.

### 3.3. Construction of a deletion of the *rbs* operon and of a point mutation in the *spoT* gene

A 5563-bp deletion of the *rbs* operon, encoding genes that allow the use of ribose as a carbon source (Abou-Sabé et al., 1982), and a point mutation in *spoT*, involved in the metabolism of the signalling molecule ppGpp (Cashel et al., 1996), were introduced into different *E. coli* strains using pDS132 (Cooper et al., 2001, 2003). The flanking sequences of the *rbs* deletion allele cloned into pDS132 were very short: 648 and 662 bp, respectively on the 5' and 3' sides of the deletion. For the *spoT* recombination, their sizes were 624 and 598 bp, respectively. The constructed *spoT* mutant strains were checked for secondary mutations, which had been shown to be a potential problem when using suicide plasmids (Johnson et al., 2003). No secondary mutations were detected (Cooper et al., 2003).

## 4. Conclusions

We have constructed the plasmid pDS132, a suicide plasmid derived from the widely used pCVD442 vector. The latter can produce untargeted integration events due to the presence of part of an IS1 element. This IS1 DNA was removed from pCVD442. We show that pDS132 is a useful suicide vector for introducing various types of mutations (deletions, point mutations, and removal of IS elements) in different genetic backgrounds in *E. coli*, with short adjacent sequences of about 600 bp on each side. Since pDS132 leaves no scars and no markers within the chromosome, it can be used to combine mutations.

## Acknowledgments

We thank Richard Lenski and members of his laboratory for sharing strains. We also thank Michael Donnenberg for the pCVD442 plasmid. This work was supported by the French CNRS, "Université Joseph Fourier" and "Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche."

## References

- Abou-Sabé, M., Pilla, J., Hazuda, D., Ninfa, A., 1982. Evolution of the D-ribose operon of *Escherichia coli* B/r. *J. Bacteriol.* 150, 762–769.
- Blattner, F.R., Plunkett 3rd, 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.
- Blomfield, I.C., Vaughn, V., Rest, R.F., Eisenstein, B.I., 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* 5, 1447–1457.
- Cashel, M., Gentry, V.J., Hernandez, V.J., Vinella, D., 1996. The stringent response. In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *E. coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, pp. 1458–1496.
- Cooper, V.S., Lenski, R.E., 2000. The population genetics of ecological specialisation in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* 407, 736–739.
- Cooper, T.F., Rozen, D.E., Lenski, R.E., 2003. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1072–1077.
- Cooper, V.S., Schneider, D., Blot, M., Lenski, R.E., 2001. Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* 183, 2834–2841.
- Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., Louarn, J.-M., 1994. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *J. Bacteriol.* 176, 3188–3195.
- Dean, D., 1981. A plasmid cloning vector for the direct selection of strains carrying recombinant plasmids. *Gene* 15, 99–102.
- Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59, 4310–4317.
- Gay, P., Lecoq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J.A., 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153, 1424–1431.
- Johnson, J.R., Lockman, H.A., Owens, K., Jelacic, S., Tarr, P.I., 2003. High frequency secondary mutations after suicide-driven allelic exchange mutagenesis in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185, 5301–5305.
- Lederberg, S., 1966. Genetics of host-controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91, 1029–1036.
- Lenski, R.E., Rose, M.R., Simpson, S.C., Tadler, S.C., 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli* I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *Am. Nat.* 138, 1315–1341.
- Link, A.J., Phillips, D., Church, G.M., 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterisation. *J. Bacteriol.* 179, 6228–6237.
- Maloy, S.R., Nunn, W.D., 1981. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 145, 1110–1112.
- Martinez-Morales, F., Borges, A.C., Martinez, A., Shanmugam, K.T., Ingram, L.O., 1999. Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J. Bacteriol.* 181, 7143–7148.
- Meganathan, R., 1996. Biosynthesis of the isoprenoid quinones menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q). In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, pp. 642–656.
- Miller, V.L., Mekalanos, J.J., 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires ToxR. *J. Bacteriol.* 170, 2575–2583.
- Murphy, K.C., Campellone, K.G., Poteete, A.R., 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* 246, 321–330.
- Naas, T., Blot, M., Fitch, W.M., Arber, W., 1994. Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 136, 721–730.
- Papadopoulos, D., Schneider, D., Meier-Eiss, J., Arber, W., Lenski, R.E., Blot, M., 1999. Genomic evolution during a 10,000 generations experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3807–3812.
- Reyrat, J.M., Pelicic, V., Gicquel, B., Rappuoli, R., 1998. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* 66, 4011–4017.
- Rozen, D.E., Lenski, R.E., 2000. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli* VIII. Dynamics of a balanced polymorphism. *Am. Nat.* 155, 24–35.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schneider, D., Duperchy, E., Depeyrot, J., Coursange, E., Lenski, R.E., Blot, M., 2002. Genomic comparisons among *Escherichia coli* strains B, K-12, and O157:H7 using IS elements as molecular markers. *BMC Microbiol.* 2, 18.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad host range mobilisation system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517.
- Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E.C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Court, D.L., 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5978–5983.

Communicated by M. Chandler

## II. La réponse stringente et l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale

---

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre sont inclus dans l'article ci-joint, prochainement soumis à *BioEssays* et intitulé « Global regulatory networks plasticity during experimental evolution in *E. coli*. » (Philippe N., Crozat E., Lenski R.E. and Schneider D.).

Au cours de l'évolution, un parallélisme génétique important est observé. En particulier, 2/3 des populations présentent des mutations dans le gène *spoT* (Cooper *et al.*, 2003). La réponse stringente est donc une cible privilégiée de l'évolution. Une seule mutation, mise en évidence dans la population Ara-1, a été analysée et ce uniquement au niveau du fitness (Cooper *et al.*, 2003). Ceci a permis de démontrer que cette mutation apporte un avantage sélectif de 9,4%. Nous avons donc décidé d'étendre ces études d'une part, en étudiant l'effet de cette mutation au niveau moléculaire, d'autre part, en analysant d'autres mutations mises en évidence dans le gène *spoT*.

Six des huit mutations identifiées dans le gène *spoT* sont situées dans le domaine C-terminal dont la fonction est inconnue (Fig.29) (Cooper *et al.*, 2003). L'étude de l'homologue bifonctionnel Rel<sub>seq</sub> de *S. equisimilis* suggère que le CTD aurait un rôle régulateur des activités de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp, portées par le domaine N-terminal (Mechold *et al.*, 2002). Les deux autres mutations ciblent le chevauchement des domaines de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp, *a priori* impliqué dans la transmission du signal entre les deux activités catalytiques (Mechold *et al.*, 2002 ; Hogg *et al.*, 2004) (Fig.15). Nous avons choisi de nous intéresser à trois mutations mises en évidence dans le domaine C-terminal dans les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4. La mutation de la population Ara-1, située à l'extrémité terminale du domaine C-terminal, remplace le résidu lysine 662, conservé chez la protéine Rel<sub>seq</sub>, par un résidu isoleucine. La mutation de la population Ara+2 est située plus au centre du domaine C-terminal et remplace le résidu arginine 575 par un résidu leucine. La mutation de la population Ara-4 est située au début du CTD, au niveau du domaine TGS, et échange le résidu tyrosine 389, conservé à la fois chez RelA et Rel<sub>seq</sub>, par une cystéine (Cooper *et al.*, 2003). L'effet de ces mutations a été étudié par construction de souches ancestrales comportant les allèles ancestral et évolués de *spoT*. Les souches

isogéniques, excepté pour le gène *spoT*, ont été comparées à différents niveaux. D'une part, l'impact des mutations *spoT* sur la croissance bactérienne a été évalué par analyse des caractéristiques de croissance des différentes souches et par des mesures de leur fitness. D'autre part, l'effet des mutations au niveau moléculaire a été étudié par analyse du métabolisme de (p)ppGpp dans les souches portant ou non les mutations. Les conséquences des mutations sur l'expression globale des gènes (Cooper *et al.*, 2003) ainsi que sur l'expression des gènes régulés positivement (*rpoS*) ou négativement (ARN stables) par (p)ppGpp ont également été évaluées. Enfin, nous avons étudié l'éventuelle influence des mutations sur les interactions récemment mises en évidence entre SpoT et d'autres protéines (Wout *et al.*, 2004 ; Butland *et al.*, 2005).

## II.1. Matériel et méthodes

### II.1.1. Matériel

#### II.1.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées au cours de ce travail sont listées dans le tableau ci-dessous. Toutes les souches sont des dérivés d'*E. coli*, à l'exception des 2 dernières, qui sont dérivées de *Saccharomyces cerevisiae*.

Souches bactériennes et de levure	Description	Méthode de construction	Référence
<b>606</b>	<i>Escherichia coli</i> B Bc251, T6 <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , <i>rmIII</i> , Ara-		Lederberg, 1966
<b>607</b>	Révertant Ara+ de 606		Lenski <i>et al.</i> , 1991
<b>A</b>	606 <i>spoT</i> <sup>-1</sup> *	v.s.** : pDS233	Cooper <i>et al.</i> , 2003
<b>NAP1</b>	606 <i>spoT</i> <sup>+2</sup> *	v.s.** : pDS243	Ce travail
<b>NAP9</b>	606 <i>spoT</i> <sup>-4</sup> *	v.s.** : pDS245	
<b>DVS17</b>	606 $\Delta$ <i>relA spoT</i> <sup>anc</sup> *	v.s.** : pDS206	
<b>NAP17</b>	606 $\Delta$ <i>relA spoT</i> <sup>-1</sup> *	v.s.** : pDS206, pDS233	
<b>NAP18</b>	606 $\Delta$ <i>relA spoT</i> <sup>+2</sup> *	v.s.** : pDS206, pDS243	
<b>NAP22</b>	606 $\Delta$ <i>relA spoT</i> <sup>-4</sup> *	v.s.** : pDS206, pDS245	
<b>DVS28</b>	606 $\Delta$ <i>relA</i> $\Delta$ <i>spoT</i>	v.s.** : pDS206, pDS217	
<b>DVS5</b>	606 $\Delta$ <i>rpoS</i>	v.s.** : pDS205	

<b>762</b>	Mélange de la population Ara-1 à 500 générations		
<b>964</b>	Mélange de la population Ara-1 à 1000 générations		
<b>1068</b>	Mélange de la population Ara-1 à 1500 générations		
<b>1164</b>	Mélange de la population Ara-1 à 2000 générations		
<b>1164A</b>	Clone isolé à 2000g de la population Ara-1		
<b>765</b>	Mélange de la population Ara-4 à 500 générations		
<b>967</b>	Mélange de la population Ara-4 à 1000 générations		
<b>1071</b>	Mélange de la population Ara-4 à 1500 générations		
<b>1167</b>	Mélange de la population Ara-4 à 2000 générations		
<b>1167A</b>	Clone isolé à 2000g de la population Ara-4		
<b>769</b>	Mélange de la population Ara+2 à 500 générations		
<b>959</b>	Mélange de la population Ara+2 à 1000 générations		
<b>1063</b>	Mélange de la population Ara+2 à 1500 générations		
<b>1159</b>	Mélange de la population Ara+2 à 2000 générations		
<b>1159A</b>	Clone isolé à 2000g de la population Ara+2		
<b>EAC1</b>	606 <i>topA</i> <sup>-1</sup> *		Crozat <i>et al.</i> , 2005
<b>BL21 (DE3)</b>	F- <i>ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm</i> (DE3). Souche utilisée comme hôte de clonage		Novagen
<b>JM109</b>	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thiΔ(lac-proAB), F'(traD36, proAB<sup>+</sup>, lacI9, lacZΔM15)</i> . Souche utilisée comme hôte de clonage		Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
<b>Top10</b>	F <sup>-</sup> , <i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL (Str<sup>R</sup>), endA1, nupG</i> . Souche utilisée comme hôte de clonage.		Invitrogen™
<b>NM6006</b>	MC4100 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion transcriptionnelle)		
<b>EM1246</b>	MC4100 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle courte)		Lange et Hengge-Aronis, 1994
<b>EM1050</b>	MC4100 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle longue)		
<b>MAV103</b>	MC4100 λRS :: <i>P1bolA-lacZ</i>		Aldea <i>et al.</i> , 1990
<b>JG17</b>	MC4100 λRS45 :: <i>PcsiD-lacZ</i>		
<b>CLG 570</b>	MC4100 <i>PosmE- Φ(-malP-lac)</i>		Bordes <i>et al.</i> , 2003
<b>CLG 700</b>	MC4100 <i>PosmY- Φ(malP-lac)</i>		Bouvier <i>et al.</i> , 1998
<b>CLG 442</b>	MC4100 <i>PosmC- Φ(malP-lac)</i>		
<b>CF10770</b>	MC4100 <i>rplA-HA-his(6)</i>		M.Cashel (comm. pers.)
<b>DHP1</b>	F <sup>-</sup> , <i>glnV44(AS), recA1, endA1, gyrA96 (Nal<sup>r</sup>), thiI, hsdR17, spoT1, rfbD1, cya</i>		Karimova <i>et al.</i> , 1998
<b>NAP24</b>	606 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion transcriptionnelle)		
<b>NAP25</b>	A λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion transcriptionnelle)		
<b>NAP26</b>	NAP1 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion transcriptionnelle)	λ** : NM6006	
<b>NAP27</b>	NAP9 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion transcriptionnelle)		
<b>NAP28</b>	606 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle courte)		
<b>NAP29</b>	A λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle courte)		
<b>NAP30</b>	NAP1 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle courte)	λ** : EM1246	
<b>NAP31</b>	NAP9 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle courte)		
<b>NAP32</b>	606 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle longue)		
<b>NAP33</b>	A λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle longue)		
<b>NAP34</b>	NAP1 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle longue)	λ** : EM1050	
<b>NAP35</b>	NAP9 λRS :: <i>PrpoS-lacZ</i> (fusion traductionnelle longue)		

Cooper et  
Lenski, 2000

Yanish-Perron *et al.*, 1985

Invitrogen™

Lange et  
Hengge-Aronis,  
1994

Aldea *et al.*,  
1990

Bordes *et al.*,  
2003

Bouvier *et al.*,  
1998

M.Cashel  
(comm. pers.)

Karimova *et al.*,  
1998

Ce travail



<b>NAP36</b> <b>NAP37</b> <b>NAP38</b> <b>NAP39</b>	606 $\lambda$ RS :: P1 <i>bolA-lacZ</i> A $\lambda$ RS :: P1 <i>bolA-lacZ</i> NAP1 $\lambda$ RS :: P1 <i>bolA-lacZ</i> NAP9 $\lambda$ RS :: P1 <i>bolA-lacZ</i>	$\lambda^{**}$ : MAV103	Ce travail
<b>NAP40</b> <b>NAP41</b> <b>NAP42</b> <b>NAP43</b>	606 $\lambda$ RS :: P <i>csiD-lacZ</i> A $\lambda$ RS :: P <i>csiD-lacZ</i> NAP1 $\lambda$ RS :: P <i>csiD-lacZ</i> NAP9 $\lambda$ RS :: P <i>csiD-lacZ</i>	$\lambda^{**}$ : JG17	Ce travail
<b>NAP44</b> <b>NAP45</b> <b>NAP46</b> <b>NAP47</b>	606 <i>malA</i> :: Posm <i>E-lacZ</i> A <i>malA</i> :: Posm <i>E-lacZ</i> NAP1 <i>malA</i> :: Posm <i>E-lacZ</i> NAP9 <i>malA</i> :: Posm <i>E-lacZ</i>	P1** : CLG 570	Ce travail
<b>NAP48</b> <b>NAP49</b> <b>NAP50</b> <b>NAP51</b>	606 <i>malA</i> :: Posm <i>Y-lacZ</i> A <i>malA</i> :: Posm <i>Y-lacZ</i> NAP1 <i>malA</i> :: Posm <i>Y-lacZ</i> NAP9 <i>malA</i> :: Posm <i>Y-lacZ</i>	P1** : CLG 700	Ce travail
<b>NAP52</b> <b>NAP53</b> <b>NAP54</b> <b>NAP55</b>	606 <i>malA</i> :: Posm <i>C-lacZ</i> A <i>malA</i> :: Posm <i>C-lacZ</i> NAP1 <i>malA</i> :: Posm <i>C-lacZ</i> NAP9 <i>malA</i> :: Posm <i>C-lacZ</i>	P1** : CLG 442	Ce travail
<b>EGY48</b>	Souche de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mata, <i>his3</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i> , op 3 <i>lexA-leu2</i> :: <i>leu2</i> / pSH18-34 <i>lacZ</i>		Kolonin <i>et al.</i> , 2000
<b>RFY206</b>	Souche de <i>S. cerevisiae</i> Mat a, <i>trp1</i> $\Delta$ :: <i>hisG</i> , <i>his3</i> $\Delta$ 200, <i>leu2-3</i> , <i>lys2</i> $\Delta$ 201, <i>ura3-52</i>		Kolonin <i>et al.</i> , 2000

\* *spoT*<sup>-1</sup> : allèle *spoT* de la population Ara-1, *spoT*<sup>+2</sup> : allèle *spoT* de la population Ara+2, *spoT*<sup>+4</sup> : allèle *spoT* de la population Ara-4, *spoT*<sup>anc</sup> : allèle *spoT* du clone ancêtre, *topA*<sup>-1</sup> : allèle *topA* de la population Ara-1.

\*\* v.s. : souches construites grâce aux vecteurs suicide cités ; P1,  $\lambda$  : souches construites par transduction des souches citées grâce aux bactériophages P1 et  $\lambda$  respectivement.

Comm. pers. : communication personnelle.

### II.1.1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés au cours de ce travail sont listés dans le tableau ci-dessous.

Plasmide	Description	Amorces utilisées pour le clonage	Référence
<b>pDS132</b>	Plasmide suicide Ori pR6K, <i>cat</i> , <i>sacB</i>		Philippe <i>et al.</i> , 2004
<b>pKO3</b>	Plasmide suicide <i>sacB</i> , <i>cat</i> , Ori <i>ts</i> pSC101		Link <i>et al.</i> , (1997)
<b>pCRII-TOPO</b>	Vecteur de clonage de produits PCR, système de criblage blanc-bleu. <i>kan</i> , <i>lacZ</i> (MCS)		Invitrogen <sup>TM</sup>
<b>pDS205</b>	pKO3 portant une délétion <i>rpoS</i>	ODS16 – ODS18	Ce travail
<b>pDS206</b>	pKO3 portant une délétion <i>relA</i>	ODS4 – ODS6	
<b>pDS217</b>	pKO3 portant une délétion <i>spoT</i>	ODS8 – ODS10	
<b>pDS233</b>	pKO3 portant l'allèle <i>spoT</i> de Ara-1 (mutation a>t en position 1985)*	ODS196 – ODS197	
<b>pDS234</b>	pKO3 portant l'allèle wt de <i>spoT</i> centré sur la position 1985*, utilisé pour remplacer l'allèle <i>spoT</i> <sup>-1</sup> par <i>spoT</i> <sup>anc</sup>		
<b>pDS242</b>	pKO3 portant l'allèle wt de <i>spoT</i> centré sur la position 1724*, utilisé pour remplacer l'allèle <i>spoT</i> <sup>+2</sup> par <i>spoT</i> <sup>anc</sup>	ODS198 – ODS199	
<b>pDS243</b>	pKO3 portant l'allèle <i>spoT</i> de Ara+2 (mutation g>t en position 1724*)		
<b>pDS244</b>	pKO3 portant l'allèle wt de <i>spoT</i> centré sur la position 1166*, utilisé pour remplacer l'allèle <i>spoT</i> <sup>-4</sup> par <i>spoT</i> <sup>anc</sup>	ODS200 – ODS201	

<b>pDS245</b>	pKO3 portant l'allèle <i>spoT</i> de Ara-4 (mutation a>g en position 1166*)		
<b>pALS10</b>	Dérivé de pBR322, <i>bla</i> , <i>relA</i> 1-743		Svitol <i>et al.</i> , 1993
<b>pALS13</b>	Dérivé de pBR322, <i>bla</i> , <i>relA</i> 1-455		
<b>pALS14</b>	Dérivé de pBR322, <i>bla</i> , <i>relA</i> 1-331		
<b>pET28</b>	Vecteur d'expression permettant la synthèse de protéines portant une étiquette His <sub>6</sub>		Novagen
<b>pMalC-2e</b>	Vecteur d'expression permettant la synthèse de protéines portant une étiquette MBP		New England Biolabs
<b>pNP1</b>	pET28- <i>cgtA</i>	YhbZ3 – YhbZ5 Wout <i>et al.</i> , 2004	Ce travail
<b>pNP2</b>	pMalC2e – <i>spoT</i> <sup>anc</sup>	SpoT1bis – SpoT2bis	
<b>pNP3</b>	pMalC2e – <i>spoT</i> <sup>-4</sup>		
<b>pNP4</b>	pMalC2e – <i>spoT</i> <sup>+2</sup>		
<b>pT18</b>	pBII-KS- <i>PlacUV5-cya</i> (codons 225-399), <i>kan</i>		Karimova <i>et al.</i> , 1998
<b>pT25</b>	pACYC184- <i>PlacUV5-cya</i> (codons 1-224), <i>kan</i>		Karimova <i>et al.</i> , 1998
<b>pEB881</b>	pT25- <i>spoT</i> <sup>anc</sup>		Bouveret, Battesti (LISM, Marseille)
<b>pEB755</b>	pT25- <i>spoT</i> <sup>-4</sup>		
<b>pEB754</b>	pT25- <i>spoT</i> <sup>+2</sup>		
<b>pEB753</b>	pT25- <i>spoT</i> <sup>-1</sup>		
<b>pEB909</b>	pT18- <i>spoT</i> <sup>anc</sup>		
<b>pEB805</b>	pT18- <i>spoT</i> <sup>-4</sup>		
<b>pEB804</b>	pT18- <i>spoT</i> <sup>+2</sup>		
<b>pEB795</b>	pT18- <i>spoT</i> <sup>-1</sup>		
<b>pEB375</b>	pT25- <i>acpP</i>		
<b>pEB379</b>	pT18- <i>acpP</i>		
<b>pEB906</b>	pT25- <i>cgtA</i>		
<b>pEB907</b>	pT18- <i>cgtA</i>		
<b>pJG4-5</b>	Plasmide comportant le domaine activateur de transcription B42. <i>Pgal-b42</i> (AD), <i>trpI</i> , <i>bla</i>		Kolonin <i>et al.</i> , 2000
<b>pEG202</b>	Plasmide comportant le domaine de fixation à l'ADN de LexA. <i>Padh-lexA</i> (DBD), <i>his3</i> , <i>bla</i>		
<b>pEB927</b>	pJG4-5 – <i>spoT</i> <sup>anc</sup>	Sous-clonage réalisé à partir des inserts <i>spoT</i> contenus dans les plasmides pEB753, pEB754, pEB755 et pEB881 (digestion <i>XhoI-EcoRI</i> )	Bouveret, Battesti (LISM, Marseille)
<b>pEB930</b>	pJG4-5 – <i>spoT</i> <sup>-1</sup>		
<b>pEB931</b>	pJG4-5 – <i>spoT</i> <sup>+2</sup>		
<b>pEB932</b>	pJG4-5 – <i>spoT</i> <sup>-4</sup>		
<b>pEB929</b>	pEG202 – <i>spoT</i> <sup>anc</sup>		
<b>pEB928</b>	pEG202 – <i>cgtA</i>	Ebm261-Ebm183	
<b>pEB926</b>	pJG4-5 – <i>cgtA</i>	Ebm261-Ebm183	

\* Les positions des mutations sont données par rapport au premier nucléotide du codon d'initiation de la traduction.

### II.1.1.3. Oligonucléotides

Les amorces utilisées au cours de ce travail sont listées dans le tableau ci-dessous.

Oligonucléotide	Séquence (5'-3')
ODS4	GTT GCG CTT AAC TTT TAG CCC
ODS6	CTC TTG CCC GCC AGG CGA TA
ODS8	GAA CTG GAC CGC CGT CTA C
ODS10	CTG TTT TCA CGC AGG TAC ATG CC
ODS16	CAC ACC AGC GAC ATT ATG GGC

ODS18	TTC CAC CGT TGC TGT TGC GT
ODS196	AAC CAT GCT TTG GGT GGT AG
ODS197	GAT GCC CGT TTT CTC CTG TC
ODS198	ACG CCC GTC GAC TTC GCT
ODS199	CGC CAA CGG CAT CTG CGG
ODS200	CTG AAA TCG AAG GGC GTT TG
ODS201	CGG CAC CTT TAA TGG GCA GA
YhbZ3	ACA AAC TCG AGC AAA TTC AAC ATA TTG CA
YhbZ5	AGA ATC ATA TGA AGT TTG TTG ATG AAG CA
SpoT1bis	TCA CAA AGC GGG GGA TCC TTG TAT CTG TT
SpoT2bis	CGT GTT GGG TTC ACT GCA GAT TAA TTT CGG
Ebm76	CAC CGA ATT CAT GAG CAC TAT CGA A
Ebm77	ACC GCT CGA GTT ACG CCT GGT GGC C
Ebm123	CAC CGA ATT CTT GTA TCT GTT TGA AAG C
Ebm124	ACC GCT CGA GTT AAT TTC GGT TTC GGG TG
Ebm182	CGA CTC TAG AAT TCA TGA AGT TTG TTG ATG AAG C
Ebm261	CGA CTC TAC AAT TGA TGA AGT TTG TTG ATG AAG C
Ebm183	ACC GCT CGA GAA GCT TAA CGC TTG TAA ATG AAC

#### II.1.1.4. Milieux de culture

##### *i. Milieux liquides*

Les principaux milieux de culture utilisés sont le milieu riche Luria Broth LB (10g/L de tryptone, 5g/L d'extrait de levure, 5g/L de NaCl, pH 7,5), et le milieu minimum Davis Minimal DM (7g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O, 2g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5g/L de citrate de sodium). Le milieu DM est complété avec 0,1g/L de MgSO<sub>4</sub>, 2mg/L de thiamine et 25mg/L, 250mg/L ou 1g/L de source de carbone (dans cette étude : glucose, glycérol ou maltose) pour les milieux DM25, DM250 et DM1000 respectivement. Les 12 populations évoluent depuis plus de 40 000 générations en DM25 glucose. Le milieu LB est utilisé pour les cultures de routine d'*E. coli* (fabrication de cellules électrocompétentes, cultures destinées à la surexpression de protéines...), alors que le milieu DM est utilisé pour toutes les analyses phénotypiques et moléculaires des souches d'intérêt (expériences de compétition, mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase, analyses protéiques...).

Le milieu TBMM (10g/L de tryptone ; 5g/L de NaCl ; 0,2% de maltose ; 10mM de MgSO<sub>4</sub> ; 1 $\mu$ g/mL de thiamine) est utilisé pour la culture des souches à infecter par des bactériophages  $\lambda$ . Le maltose permet l'expression de la protéine LamB, récepteur du bactériophage.

Le milieu MOPS glucose (MOPS 40mM, tricine 4mM, FeSO<sub>4</sub> 0,01mM, NH<sub>4</sub>Cl 9,5mM, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,26mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, MgCl<sub>2</sub> 1,06mM, NaCl 50mM, glucose 0,2%, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(MO<sub>7</sub>)<sub>24</sub> 3nm, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,4 $\mu$ M, CoCl<sub>2</sub> 30nM, CuSO<sub>4</sub> 10nM, MnCl<sub>2</sub> 80nM, ZnSO<sub>4</sub> 10nM, thiamine 1 $\mu$ g/mL) est utilisé pour les dosages de (p)(p)ppGpp. Ce milieu est supplémenté en

phosphore radiomarqué  $^{32}\text{P}$  ( $10\mu\text{Ci/mL}$ ) pour les études de métabolisme de (p)ppGpp ou en phosphate de potassium ( $2,0\text{mM}$ ) pour les cultures non radioactives. Lors des études de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp, ce milieu est supplémenté en sérine hydroxamate ( $0,2\text{mg/mL}$ ) afin de créer une carence artificielle en sérine. La carence est réversée par ajout de chloramphénicol ( $0,1\text{mg/mL}$ ), sérine ( $2\text{mg/mL}$ ), et d'un mélange des 20 acides aminés ( $0,1\text{mg/mL}$  chacun).

Les milieux YPD (Yeast Peptone Dextrose) ( $1\%$  extrait de levure,  $2\%$  glucose,  $2\%$  peptone,  $2\%$  agar, pH 6,9) et SD ( $0,67\%$  extrait de levure dépourvu d'acides aminés,  $2\%$  glucose,  $2\%$  agar, pH 6,9) sont utilisés pour les cultures de levure. Le milieu SD peut être supplémenté avec  $0,72\text{g/L}$  d'un mélange d'acides aminés et de bases azotées ( $200\text{mg}$  adénine,  $200\text{mg}$  arginine,  $200\text{mg}$  histidine,  $600\text{mg}$  leucine,  $300\text{mg}$  lysine,  $200\text{mg}$  méthionine,  $500\text{mg}$  phénylalanine,  $2000\text{mg}$  thréonine,  $200\text{mg}$  tryptophane,  $300\text{mg}$  tyrosine et  $200\text{mg}$  uracile). Ce milieu peut être utilisé dépourvu de certains suppléments, tels que l'uracile, l'histidine ou le tryptophane.

Les différents milieux peuvent être supplémentés en ampicilline ( $100\mu\text{g/mL}$ ) ou chloramphénicol ( $30\mu\text{g/mL}$ ) selon les besoins. Les dilutions de cultures bactériennes s'effectuent dans un tampon salin contenant  $0,9\%$  de NaCl.

Sauf précisé, toutes les cultures bactériennes sont effectuées à  $37^\circ\text{C}$  avec agitation. Les cultures de levures sont effectuées à  $30^\circ\text{C}$ .

## *ii. Milieux solides*

Le milieu LB est également utilisé sous forme solide, après addition de  $12\text{g/L}$  de bacto-agar. Le même milieu mais sans NaCl et contenant  $5\%$  de saccharose est utilisé pour la sélection de clones résistants au sucrose lors de la reconstruction de souches isogéniques par recombinaison homologe dans le chromosome (voir section II.1.2.2). Le milieu SD peut aussi être utilisé sous forme solide, après addition de  $12\text{g/L}$  de bacto-agar.

Le milieu TA (Tétrazolium-Arabinose) ( $10\text{g/L}$  de tryptone ;  $1\text{g/L}$  d'extrait de levure ;  $5\text{g/L}$  de NaCl ;  $0,05\%$  d'antimousse ;  $1\%$  d'arabinose ;  $0,005\%$  de tétrazolium ;  $12\text{g/L}$  d'agar) est utilisé pour déterminer la capacité des bactéries à utiliser l'arabinose comme source de carbone. Il permet de distinguer les compétiteurs lors des expériences de compétition. Sur ce milieu, les bactéries capables d'utiliser l'arabinose comme source de carbone apparaissent roses (Ara+), sinon elles sont rouges (Ara-).

Le milieu M9-glucose ( $9\text{g/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $3\text{g/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5\text{g/L}$  NaCl,  $1\text{g/L}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $12\text{g/L}$  agar,  $1\text{mM}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $0,1\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\mu\text{g/mL}$   $\text{FeSO}_4$ ,  $1\mu\text{g/mL}$  thiamine,  $0,2\%$

glucose) peut être supplémenté en casaminoacids (0,2%) ou AT (3-amino-1,2,4-triazole) (5 à 20mM) et est alors utilisé pour des tests phénotypiques destinés à évaluer le niveau intracellulaire de (p)ppGpp. Il est également utilisé lors des transductions par les phages P1 et  $\lambda$ , et peut alors être supplémenté en X-gal (40 $\mu$ g/mL). Il peut également être utilisé sous forme d'agar mou (7g/L agar), lors des transductions par le phage  $\lambda$ .

En fonction des expériences, des antibiotiques (chloramphénicol 30  $\mu$ g/mL, ampicilline 100 $\mu$ g/mL, kanamycine 50 $\mu$ g/mL) peuvent être ajoutés aux milieux de culture.

## **II.1.2. Méthodes**

### **II.1.2.1. Techniques classiques de biologie moléculaire et génétique**

#### *i. Electrotransformations de souches bactériennes*

Les souches d'intérêt sont cultivées jusqu'en milieu de phase exponentielle (DO 600nm = 0,5) en LB. Un traitement à base de glycérol à 10% permet de rendre les cellules électrocompétentes (Sambrook *et al.*, 1989). Quarante microlitres de cellules électrocompétentes sont mélangés à 50ng de vecteur et le mélange est soumis à une décharge électrique (4,5ms à 2,5kV, 25 $\mu$ F, 200 $\Omega$ , appareil Biorad). Les cellules sont resuspendues dans 1mL de LB, incubées 1 heure à 37°C, ou 30°C lorsqu'un plasmide thermosensible est utilisé, et étalées sur un milieu sélectif.

#### *ii. Transformation de souches de levure*

Les souches EGY48 et RFY206 utilisées dans cette étude sont respectivement cultivées en milieu SD dépourvu d'uracile et YPD pendant 48h. Les cultures sont centrifugées 1min à 15 000rpm et le culot cellulaire est resuspendu dans une solution comprenant 10 $\mu$ L d'ADN de sperme de hareng à 10mg/mL, 1 $\mu$ L du plasmide d'intérêt, 500 $\mu$ L de PEG 40% (PEG 4000 0,4g/mL, LiAc 0,01g/mL, Tris HCl 1M pH7,2, EDTA 0,5M) et 55 $\mu$ L de DMSO. Les suspensions sont incubées pendant 15min à température ambiante, puis 15min à 42°C. Cinq cents microlitres de tampon TE (Tris Hcl 10mM pH 7,5, EDTA 0,5mM) sont ajoutés aux suspensions qui sont ensuite centrifugées 1min à 15 000rpm. Le culot de cellules est lavé avec 1mL de tampon TE et centrifugé dans les mêmes conditions. Les cellules sont resuspendues dans 100 $\mu$ L de tampon TE et étalées sur milieu sélectif approprié. Les boîtes sont incubées 48h à 30°C.

### *iii. PCRs*

Les PCRs effectuées en vue de clonages sont réalisées grâce à une Taq polymérase à haute fidélité (High fidelity PCR enzyme mix, Fermentas), afin de réduire la probabilité d'introduction de mutations. La Taq DNA Polymérase (Fermentas) est utilisée pour les PCRs de contrôle. Ces enzymes sont utilisées selon les recommandations du fournisseur. Chaque échantillon contient le tampon correspondant à l'enzyme utilisée (1X), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 5mM de dNTPs, 400µM de chaque amorce, 2 unités de Taq polymérase et 5µL d'ADN ou de suspension cellulaire. Les réactions de PCR débutent par une étape de dénaturation de l'ADN 3 minutes à 94°C, puis sont poursuivies par 20 à 30 cycles de dénaturation / hybridation / polymérisation (1 minute à 94°C, 1 minute à la température de fusion des amorces – 5°C, 1 minute/1kb de produit PCR à 72°C). L'élongation des fragments d'ADN est achevée par une étape de 10 minutes à 72°C. Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et peuvent être purifiés grâce au PCR Purification kit (Qiagen) avant clonage.

### *iv. Réactions enzymatiques*

Les enzymes de restriction, la ligase, le fragment de Klenow et d'autres enzymes sont utilisés selon les recommandations des fournisseurs (Fermentas, New England Biolabs).

#### II.1.2.2. Construction de mutants au moyen du plasmide-suicide pKO3

Le remplacement d'allèles des gènes *spoT*, *relA* et *rpoS* est réalisé grâce au plasmide-suicide pKO3, qui comporte une origine de répllication thermosensible (Température restrictive : 43°C, Température permissive : 30°C), un marqueur de résistance au chloramphénicol et le marqueur de contre-sélection *sacB* (Link *et al.*, 1997). Deux types d'allèles sont utilisés. D'une part, les allèles évolués de *spoT* ou l'allèle ancestral correspondant sont utilisés après amplification d'un fragment de 1200pb centré sur la mutation. D'autre part, des délétions en phase des gènes *spoT*, *rpoS* et *relA* sont construites par amplification de deux fragments de 600pb, l'un correspondant à la partie 5' du gène, le deuxième correspondant à la partie 3'. Les deux fragments sont ensuite ligaturés ensemble, ce qui aboutit à un fragment correspondant à une délétion en phase du gène d'intérêt qui comporte le codon d'initiation de la traduction, le codon stop et éventuellement quelques codons supplémentaires entre les deux. Les différents fragments sont clonés dans le plasmide pCR-II TOPO (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Le plasmide est amplifié et purifié grâce au kit QIAprep spin miniprep (Qiagen). L'allèle cloné est extrait par

digestion grâce à deux enzymes qui ne présentent pas de site de restriction dans l'insert, par exemple par *Bam*HI, dont le site de coupure est ensuite comblé par le fragment de Klenow formant des extrémités franches, et par *Not*I. Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer l'insert du plasmide. L'insert est purifié grâce à un kit d'extraction de gel (QIAquick gel extraction kit, Qiagen). Il est ensuite cloné dans le plasmide suicide pKO3 préalablement digéré par *Sma*I, ce qui génère des extrémités franches, et *Not*I. Le plasmide résultant est introduit dans la souche d'intérêt par électrotransformation. Les cellules comportant le plasmide sont sélectionnées par étalement sur LB-agar chloramphénicol et incubation à 30°C. La première étape du remplacement d'allèle consiste à sélectionner l'intégration du vecteur dans le chromosome par un évènement de recombinaison homologue. Une colonie porteuse du plasmide est diluée dans du tampon salin ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ). Les différentes dilutions sont ensuite étalées sur LB-agar chloramphénicol, et incubées à 42°C (température restrictive) pendant une nuit. Dans ces conditions, seules les bactéries ayant intégré le plasmide dans leur chromosome se développent. Une colonie choisie arbitrairement est alors resuspendue dans 1mL de tampon salin, puis diluée de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ . La deuxième étape consiste à sélectionner l'excision du plasmide par un deuxième évènement de recombinaison homologue aboutissant au remplacement d'allèle dans théoriquement 50% des cas. Le vecteur comporte le marqueur de contre-sélection *sacB*, létal pour les bactéries Gram- cultivées en présence de sucrose. Les dilutions sont donc étalées sur LB-agar sans NaCl et comportant 5% de sucrose, puis incubées une nuit à température permissive (30°C). Seules les bactéries ayant perdu le plasmide peuvent survivre sur ce milieu. Cinquante à 100 colonies sont repiquées sur LB-agar et LB-agar chloramphénicol et incubées à 30°C pendant une nuit. Les clones sensibles au chloramphénicol sont ensuite resuspendus dans 300µL de LB glycérol 20% et conservés à – 80°C. Les clones portant l'allèle d'intérêt sont criblés soit par PCR et restriction enzymatique lorsque le nouvel allèle présente un profil de restriction différent de l'allèle de départ, soit par séquençage. Lorsque l'allèle en question est une délétion, le criblage est effectué par PCR et détection des différences de taille entre produits PCR.

#### II.1.2.3. Détermination du fitness des bactéries : expériences de compétition

Les compétitions sont toujours réalisées entre des souches de marqueurs arabinose opposés, ce qui permet de les distinguer (voir introduction section V.2.1). Ce marqueur est neutre dans ces conditions (Lenski *et al.*, 1991). Les compétitions peuvent être effectuées entre l'ancêtre Ara- portant un allèle évolué introduit par recombinaison homologue et l'ancêtre Ara+ portant l'allèle ancestral du gène considéré. Ces deux souches sont isogéniques

excepté pour le gène d'intérêt et le marqueur arabinose. Un témoin de compétition entre les deux ancêtres initiaux Ara<sup>+</sup> et Ara<sup>-</sup> est toujours réalisé en parallèle. Les compétitions peuvent être réalisées pendant 24h ou avec des transferts journaliers par dilution 1/100 pendant 6 jours, afin de détecter de faibles effets des mutations sur le fitness. Dans tous les cas, les compétitions incluent les mêmes phases de croissance rencontrées par les bactéries au cours de l'évolution expérimentale, c'est-à-dire une phase de latence, une phase de croissance exponentielle, et l'épuisement du glucose conduisant à la phase stationnaire (Vasi et Lenski, 1994).

Les deux souches compétitrices sont cultivées une nuit dans 2mL de DM1000 glucose. Les cultures sont ensuite diluées au 1/10 000ème dans 10mL de DM25 glucose, le milieu de l'évolution, et cultivées 24h à 37°C, afin de permettre aux cellules de s'acclimater au milieu. Ceci est réalisé en 6 exemplaires indépendants. Les compétitions consistent alors à mettre en co-culture les deux souches. Elles sont mélangées en proportions égales (1/200) dans 10mL de DM25 glucose, 6 fois de façon indépendante, à partir de chacune des six précultures. Au moment du mélange (jour 0 de la compétition) et au bout de 24h (jour 1) ou de 6 jours, les co-cultures sont diluées ( $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  respectivement) et 100µL sont étalés sur milieu TA (tétrazolium arabinose). Le marqueur arabinose permet de distinguer les compétiteurs sur ce milieu. Les souches Ara<sup>+</sup> apparaissent roses, tandis que les souches Ara<sup>-</sup> sont rouges. La concentration de chaque compétiteur peut donc être calculée par comptage des colonies. Le fitness est mesuré par calcul du ratio des taux de croissance des deux compétiteurs grâce à la formule suivante :  $\ln(N1^A/N0^A * 100) / \ln(N1^B/N0^B * 100)$  (N1 : nombre de colonies au jour 1, N0 : nombre de colonies au moment du mélange, A : compétiteur A, portant l'allèle évolué étudié, B : compétiteur B). Des tests statistiques de Student sont effectués pour déterminer si les valeurs de fitness diffèrent significativement de la valeur 1 correspondant à l'hypothèse nulle. Cette expérience peut aussi être réalisée dans d'autres milieux de culture, ainsi qu'avec n'importe quelle souche bactérienne (clones évolués, clones évolués dans lesquels un allèle évolué a été remplacé par un allèle ancestral, ancêtre portant une mutation...).

#### II.1.2.4. Transduction généralisée par le bactériophage P1

Cette technique a été utilisée pour introduire des fusions transcriptionnelles Px-*lacZ* dans le chromosome de souches d'intérêt. Elle comporte deux étapes. Dans un premier temps, la souche donneuse est infectée par le bactériophage P1<sup>vir</sup>, ce qui permet d'obtenir une banque de particules phagiques dont certaines comportent des fragments d'environ 100Kpb



du chromosome de la souche donneuse. Certains de ces fragments portent les fusions *Px-lacZ*. La souche donneuse est cultivée dans 3mL de LB pendant une nuit. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5min à 8000rpm, le surnageant est éliminé et les bactéries sont resuspendues dans 1mL  $\text{MgSO}_4$  10mM,  $\text{CaCl}_2$  5mM. Les cellules sont ensuite mélangées à différentes concentrations de phage P1<sub>vir</sub> (150 $\mu\text{L}$  de cellules + 0 (contrôle), 0,1, 0,3, 1 et 3 $\mu\text{L}$  de stock de phage). Les mélanges sont incubés à 37°C pendant 15 minutes sans agitation afin de permettre l'adsorption du phage sur les cellules. Trois millilitres de LB contenant du  $\text{MgSO}_4$  10mM et du  $\text{CaCl}_2$  5mM sont ajoutés aux mélanges, ensuite incubés à 37°C avec agitation pendant 4 à 6h, jusqu'à obtention d'une lyse presque complète. Les lysats sont traités par ajout de quelques gouttes de chloroforme afin d'éliminer les bactéries viables, puis centrifugés 10min à 13000rpm. Le stock de phage (surnageant) est conservé à 4°C. La deuxième étape consiste à infecter la souche receveuse avec ce stock de phage, afin de transduire les fusions *Px-lacZ* sur le chromosome de la receveuse. La souche receveuse est cultivée dans 3mL de LB pendant une nuit ou dans 10mL de LB jusqu'en milieu de phase de croissance exponentielle. Les cultures sont centrifugées (5min, 8000rpm), le surnageant éliminé, et les cellules sont resuspendues dans 1mL de  $\text{MgSO}_4$  5mM,  $\text{CaCl}_2$  2,5mM. Ces suspensions sont diluées dans le même tampon au 1/10 et au 1/100. Cent microlitres de chaque dilution sont incubés en présence de 0,5 et 5 $\mu\text{L}$  du stock de phage préparé précédemment, pendant 1h à 37°C sans agitation. Un contrôle est également réalisé avec les cellules seules. Un millilitre d'EGTA 10mM pH7 est ajouté à chaque mélange afin de chélater le magnésium et le calcium nécessaires à l'infection des cellules par les phages. Ceci permet de stopper l'infection. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures avec agitation, puis centrifugées (5min, 8000rpm) et les cellules sont resuspendues dans 0,2mL d'EGTA 10mM pH7. Les bactéries sont striées sur M9 glucose X-gal afin de repérer facilement les clones ayant intégré les fusions *Px-lacZ*, qui apparaissent bleus. Ceux-ci sont striés à nouveau sur le même milieu jusqu'à obtention d'une culture homogène. Celle-ci est alors conservée en LB glycérol 20% à -80°C. Plusieurs clones par transduction sont sélectionnés pour mesurer les activités  $\beta$ -galactosidase.

#### II.1.2.5. Infection par le bactériophage $\lambda$

Cette technique a été utilisée pour introduire des fusions transcriptionnelles et traductionnelles *Px-lacZ* en monocopies au niveau du site d'attachement du bactériophage  $\lambda$  des souches d'intérêt. Il faut noter que les souches donneuses utilisées dans ce travail ont déjà

été construites et portent les fusions au niveau du site d'attachement de  $\lambda$ . La souche donneuse est cultivée dans 2mL de LB pendant une nuit puis la culture est traitée au chloroforme afin de tuer les bactéries. Les particules phagiques qui se forment spontanément au cours de la culture sont récupérées par centrifugation des suspensions (10min à 13000rpm, 4°C) et récupération du surnageant. La souche receveuse est cultivée une nuit dans du milieu TBMM, contenant du maltose qui permet l'induction de la protéine LamB, le récepteur du bactériophage  $\lambda$ . La culture est centrifugée (5min, 8000rpm), le surnageant éliminé et les bactéries sont resuspendues dans 2mL de  $\text{MgSO}_4$  10mM. Cent microlitres de cellules ainsi que 100 $\mu\text{L}$  de stock de phage  $\lambda$  dilué  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  sont mélangés à 3mL de M9-glucose 0,7% agar en surfusion (45°C) et déposés sur M9-glucose X-gal. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C. Au centre des plages de lyse bleues se situent des cellules lysogènes ayant intégré dans leur chromosome le phage  $\lambda$  portant la fusion *lacZ*. Au moyen de cure-dents, le centre de quelques plages de lyse bleues est strié à nouveau sur M9 glucose X-gal, jusqu'à obtention de cultures bleues homogènes. Ces cultures sont conservées dans du LB glycérol 20% à -80°C. Afin de s'assurer que les clones sélectionnés ne comportent qu'une seule copie du bactériophage  $\lambda$ , ils sont analysés par PCRs (Powell *et al.*, 1994).

#### II.1.2.6. Mesures des concentrations en ADN, ARN et protéines

Trois cultures indépendantes des différentes souches bactériennes sont réalisées dans le milieu choisi à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Des échantillons de 5mL sont prélevés en phase de croissance exponentielle ( $\text{DO}=0,15$  à  $0,2$  selon le milieu de culture) et en phase stationnaire (24h). La concentration cellulaire des échantillons est déterminée par dilutions, étalements sur LB-agar et comptage des colonies. Les échantillons sont centrifugés (15min, 4500rpm, 4°C) et concentrés dans de l'eau distillée stérile pour atteindre une  $\text{DO}$  à 600nm égale à  $0,8$ . Les cellules sont lysées par mélange de 800 $\mu\text{L}$  de suspension bactérienne et 200 $\mu\text{L}$  de solution de lyse 5X ( $\text{NaCl}$  1M, EDTA 50mM, SDS 0,25%). Cette lyse s'effectue à chaud, à 65°C environ. Les lysats sont dilués au 1/10 et au 1/20. En guise de contrôle, 200 $\mu\text{L}$  de solution de lyse sont mélangés à 800 $\mu\text{L}$  d'eau, et dilués au 1/10 et au 1/20. Pour une même culture, la concentration en ADN et ARN des lysats dilués est évaluée trois fois de façon indépendante grâce aux kits de dosage Quant-it™ DNA High Sensitivity et Quant-it™ RNA (Molecular Probes, Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Ces kits de dosage contiennent des réactifs qui émettent de la fluorescence à des longueurs d'onde précises en présence d'ADN ou d'ARN. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration en acides nucléiques. La concentration en protéines des lysats non dilués est

évaluée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Deux cents microlitres de réactif de Bradford (Biorad) sont mélangés à 760 $\mu$ L d'eau et 40 $\mu$ L de lysat. La densité optique des échantillons est mesurée à 595nm et comparée à une gamme étalon effectuée grâce à des concentrations définies d'albumine de sérum bovin ou BSA (0 à 10 $\mu$ g).

Les concentrations cellulaires en ADN, ARN et protéines de chaque souche sont calculées à partir des trois cultures indépendantes en tenant compte du facteur de concentration des échantillons avant la lyse. La déviation standard est calculée à partir de ces expériences effectuées en triplicatas afin d'évaluer la significativité des résultats.

#### II.1.2.7. Mesures d'activités $\beta$ -galactosidase

Trois cultures indépendantes des différentes souches bactériennes portant les fusions transcriptionnelles ou traductionnelles *Px-lacZ* sont réalisées dans 100mL de DM250 glucose ou glycérol, ou dans 50mL de MOPS glucose, à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Cinquante millilitres (DM250) ou 25mL (MOPS glucose) de culture sont prélevés en phase stationnaire (8h ou 24h) et centrifugés (15min, 4500rpm, 4°C). Les surnageants sont éliminés et les culots cellulaires sont resuspendus dans 1mL de solution de lyse [Tampon Z (0,6M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,4M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0,1M KCl, 0,01M MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O), 1mM DTT, 1,25mg/mL DNase I, 8mg/mL lysozyme]. Les suspensions sont incubées pendant 30min à 37°C avec agitation. Elles sont ensuite centrifugées (10min, 13000rpm, 4°C) et le surnageant est récupéré, il constitue le lysat cellulaire. Cent soixante microlitres de chaque lysat sont mélangés à 40 $\mu$ L d'ONPG (8mg/mL ONPG en solution dans 164mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O et 36mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O), puis incubés à température ambiante pendant un temps défini, jusqu'à obtention d'une coloration jaune non saturée. Si l'activité  $\beta$ -galactosidase est trop importante, les lysats peuvent être préalablement dilués dans du tampon Z avant dosage. Les réactions enzymatiques sont stoppées par ajout de 500 $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Ceci est réalisé trois fois de façon indépendante pour chaque lysat. L'activité  $\beta$ -galactosidase est évaluée par mesure de densité optique des échantillons à 420nm. La concentration protéique des échantillons est évaluée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). L'activité  $\beta$ -galactosidase est exprimée en nanokatal (nanomoles de substrat utilisé par seconde et par microgramme de protéines). La significativité des résultats est évaluée par calcul de la déviation standard à partir de ces expériences réalisées trois fois de façon indépendante.

#### II.1.2.8. Etude du métabolisme de (p)ppGpp

##### *i. Mesure de la cinétique d'accumulation de (p)ppGpp*

Les différentes souches sont striées sur LB-agar. Quelques colonies sont resuspendues dans 100µL de milieu MOPS glucose sans phosphate contenant de la sérine hydroxamate (0,2mg/mL). Ceci est réalisé trois fois de façon indépendante pour une même souche. Ces suspensions sont ensuite diluées 25 fois dans le même milieu contenant 10µCi/mL de  $^{32}\text{P}$  carrier free (MP Biomedicals). Cette dilution constitue le point de départ de l'expérience. La sérine hydroxamate provoque une carence en ARNt chargés en sérine, ce qui déclenche l'accumulation de (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996) dans lequel du  $^{32}\text{P}$  est incorporé (Fig.36). Des prélèvements de 50µL sont effectués toutes les 5 minutes pendant 20 à 30 minutes et immédiatement mélangés à 50µL d'acide formique 13M, ce qui provoque la lyse bactérienne. Cinq microlitres de chaque échantillon sont déposés sur une feuille de chromatographie sur couche mince (CCM) recouverte de cellulose et imprégnée de polyéthylèneimine (Macherey-Nagel). La migration des nucléotides phosphatés par CCM s'effectue dans du tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5M, pH3,4 pendant 1h à 1h30. Les feuilles de chromatographie sont ensuite séchées à température ambiante et exposées sur des écrans de phosphore (Fujifilm) pendant quelques heures, avant d'être révélées grâce à un scanner phosphoimager (FLA-8000 Fujifilm). La concentration de (p)ppGpp et GTP dans chaque dépôt est évaluée par mesure de l'intensité des spots grâce au logiciel de quantification d'image Image Gauge (Fujifilm) (Fig.36). La trajectoire d'accumulation de (p)ppGpp est évaluée par calcul du ratio (p)ppGpp/(GTP+(p)ppGpp) en fonction du temps de réaction. La significativité des résultats est évaluée par calcul de la déviation standard à partir de ces expériences réalisées trois fois de façon indépendante.

##### *ii. Mesure de la cinétique de dégradation de (p)ppGpp*

Le début de l'expérience consiste à déclencher l'accumulation de (p)ppGpp et est donc identique à la méthode décrite ci-dessus. Quinze minutes après dilution des cellules dans du MOPS glucose contenant de la sérine hydroxamate et du  $^{32}\text{P}$ , du chloramphénicol (0,1mg/mL), de la sérine (2mg/mL) ainsi qu'un mélange de 20 acides aminés (0,1mg/mL chacun) sont ajoutés aux suspensions cellulaires. Ceci permet de réverser la carence (Cashel *et al.*, 1996). L'accumulation de (p)ppGpp est stoppée et sa dégradation est déclenchée. Des échantillons sont prélevés toutes les 10 secondes pendant deux minutes et traités de la même façon que précédemment. La trajectoire de dégradation de (p)ppGpp est évaluée par calcul du

ratio de la quantité de (p)ppGpp lors des prélèvements sur la quantité de (p)ppGpp à T0. Ces quantités sont transformées en logarithmes de base 10, car la vitesse de dégradation de (p)ppGpp est exponentielle (réaction d'ordre 1). La significativité des résultats est évaluée par calcul de la déviation standard à partir de ces expériences réalisées trois fois de façon indépendante.

### *iii. Métabolisme de (p)ppGpp au cours de la croissance bactérienne*

Les différentes souches sont d'abord cultivées en milieu MOPS glucose contenant 2mM de phosphate de potassium pendant une nuit à 37°C. Ces cultures sont ensuite diluées au 1/100 dans le même milieu de culture, afin de mesurer l'évolution de la croissance bactérienne par mesures de DO à 600nm. En parallèle, les cultures sont également diluées au 1/100 dans du milieu MOPS glucose sans phosphate. Lorsque la DO 600nm atteint environ 0,02, 10µCi/mL de <sup>32</sup>P sont ajoutés à ces dernières cultures, ce qui permet de suivre l'évolution de la quantité de (p)ppGpp au cours de la croissance. Des échantillons de ces cultures sont prélevés toutes les 30 minutes après ajout de <sup>32</sup>P et traités comme décrit dans la partie II.1.2.8.i. La quantité de (p)ppGpp au cours de la croissance est évaluée de la même façon que dans la partie II.1.2.8.i. La significativité des résultats est évaluée par calcul de la déviation standard à partir de ces expériences réalisées trois fois de façon indépendante.

### II.1.2.9. Western-blot

Trois cultures indépendantes des différentes souches bactériennes sont réalisées dans 200mL de DM250 glucose à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Cent et cinquante millilitres de culture sont prélevés respectivement en phase exponentielle (DO 600nm = 0,15) et en phase stationnaire (8h ou 24h). Les prélèvements sont centrifugés pendant 15min à 4500rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont resuspendus dans 500µL de tampon B 5X (100mM HEPES pH7,4, 5mM EDTA pH8, 50% glycérol, 5mM DTT) et soniqués pendant 30 secondes, à raison de 8 impulsions de 5 secondes espacées d'une seconde (amplitude de sonication : 30%). Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13000 rpm à 4°C et la concentration protéique des surnageants est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Des échantillons de 20µL contenant 20µg de protéines et 5µL de solution de dénaturation pour gel SDS-PAGE 5X (250mM Tris HCl pH6,8, 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% bleu de bromophénol, 10% glycérol) sont déposés sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (gel de concentration : 5%

acrylamide, 0,13M Tris HCl pH6,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,01% Temed (v/v), gel de séparation : 10 à 15% acrylamide selon la masse moléculaire de la protéine d'intérêt, 0,39M Tris HCl pH8,8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,04% Temed (v/v)). La migration des échantillons s'effectue à raison de 15mA par gel pendant environ 1h30 dans du tampon d'électrophorèse (Tris 3g/L, glycine 18,8g/L, SDS 0,1%), en parallèle avec 5µL de marqueur de masse moléculaire (Page Ruler prestained protein ladder, Fermentas). Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur membrane de PVDF (Amersham), par migration à 100V pendant une heure en tampon de transfert (glycine 11,3g/L, Tris 2,4g/L, éthanol 20%). Les membranes sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit ou à température ambiante pendant une heure dans du tampon PBS (8g/L NaCl, 0,2g/L KCl, 1,44g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,2g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4) contenant 5% de lait. Après cette étape de blocage, les membranes sont lavées 3 fois pendant 10 minutes dans du tampon PBS-Tween 0,2% à température ambiante. Elles sont alors incubées en présence de l'anticorps primaire dilué à concentration adéquate (selon les recommandations des fournisseurs) dans du tampon PBS-Tween 0,2%-lait 5% pendant une heure à température ambiante. Trois lavages dans du tampon PBS-Tween 0,2% sont à nouveau effectués pendant 10min à température ambiante, afin d'éliminer les anticorps non fixés. Les membranes sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire adéquat dilué dans du tampon PBS-Tween 0,2%-lait 5% selon les recommandations des fournisseurs (anticorps anti-lapin et anti-souris couplés à la phosphatase alcaline (Proméga), anticorps anti-poulet couplé à la peroxydase du radis noir (HRP) (Sigma)). Trois lavages sont à nouveau effectués. La révélation des Western-blots s'effectue soit par la méthode colorimétrique NBT-BCIP (Chemicon International) lorsque l'anticorps secondaire est couplé à la phosphatase alcaline, soit par la méthode d'électrochimiluminescence ECL (Amersham) lorsque l'anticorps secondaire est couplé à la HRP selon les recommandations des fournisseurs. Ces Western-blots sont réalisés afin d'évaluer le niveau des protéines RpoS (anticorps de lapin anti-RpoS fourni par Regine Hengge, Berlin), DksA (anticorps de poulet anti-DksA fourni par Michael Cashel, NIH, USA), RpoA (anticorps de souris anti-RpoA, Neoclone), et SpoT (anticorps de lapin anti-SpoT fournis par Michael Cashel). Ils sont également réalisés afin de détecter les protéines de fusion His<sub>6</sub>-CgtA et MBP-SpoT (anticorps de souris anti-His<sub>6</sub> et anti-MBP, Amersham Bioscience, NEB).

#### II.1.2.10. Etude de la stabilité de RpoS

Les souches bactériennes sont cultivées pendant 8h dans 15mL de DM1000 glucose à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Une forte concentration de chloramphénicol est ajoutée aux cultures (200µg/mL), afin de bloquer toute synthèse protéique. Des échantillons de 2mL sont immédiatement prélevés, puis toutes les demi-heures durant deux heures. Ces prélèvements sont centrifugés à 13 000rpm pendant 10min à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont resuspendus dans 150µL de tampon B 5X. Les échantillons sont traités comme décrit dans la partie II.1.2.9. La quantité de la protéine RpoS contenue dans chaque échantillon est mesurée par Western-blot. Ceci permet d'évaluer la demi-vie de la protéine.

#### II.1.2.11. Purification de sous-unités ribosomiques 50S

La souche CF10770 (fournie par Michael Cashel) est cultivée pendant 48h dans 10L de LB à partir d'une préculture de nuit diluée au 1/200. Cette souche comporte la protéine ribosomique L1 fusionnée à une étiquette hémagglutinine ainsi qu'à une étiquette histidine. La culture est centrifugée et le culot cellulaire est pesé. Le protocole suivant est utilisé pour 20 grammes de cellules. Le culot est resuspendu dans 100mL de tampon RB (acétate de Tris pH8 50mM, acétate de magnésium 15mM, acétate de potassium 60mM, acétate d'ammonium 27mM, EDTA 0,2mM) contenant 1mM de DTT et 0,1M de NH<sub>4</sub>Cl. Les cellules sont lysées par ajout de lysozyme (1mg/mL) et agitation de la suspension durant 1h à 4°C. La suspension cellulaire est ensuite soniquée pendant 5 minutes à raison d'impulsions de 30 secondes espacées de 1 minute. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation de la suspension pendant 40min à 15 000 rpm (4°C) et récupération du surnageant. Celui-ci est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation en polycarbonate pour rotor 60Ti et centrifugé pendant 4h à 30 000rpm (65 000g) (ultracentrifugeuse Beckman). Le surnageant ainsi que la pellicule brune composée de débris cellulaires située au dessus des culots sont éliminés. Les culots contiennent majoritairement des ribosomes et des débris cellulaires. Ils sont resuspendus dans 8mL de tampon RB contenant 1mM DTT et 1M NH<sub>4</sub>Cl, par agitation à 4°C durant une nuit. Les suspensions sont ensuite rassemblées et centrifugées à 10 000rpm pendant 15min à 4°C afin d'éliminer le matériel insoluble. Les surnageants sont déposés au-dessus de coussins de sucrose de 5mL (10% sucrose dans tampon RB, 1mM DTT, 1M NH<sub>4</sub>Cl) dans des tubes à ultracentrifugation pour rotor 60Ti et centrifugés à 32 000rpm (75 000g) durant 4h. Les culots sont traités deux fois de la même façon que précédemment afin

d'éliminer le maximum de contaminations, et finalement resuspendus dans 2mL de solution à basse concentration de magnésium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1M, acétate de magnésium 1mM, EDTA 0,5mM, Tris-HCl pH7,5 20mM), afin de séparer les sous-unités ribosomiques. Les suspensions sont rassemblées et la concentration en ribosomes est évaluée par mesure de la densité optique à 260nm d'une dilution au 1/1000 de l'échantillon (39 unités de DO 260nm/mL = 1pmol de ribosomes 70S/ $\mu\text{L}$ ). Cette solution peut être conservée à  $-80^\circ\text{C}$ .

Les échantillons sont déposés sur gradients de sucrose (7 à 34% de sucrose dilués dans la solution à basse concentration de magnésium), afin de séparer les sous-unités ribosomiques par centrifugation à 40 000rpm (120 000g) pendant 16h (rotor 60Ti). Les sous-unités 50S constituent un culot, tandis que la majorité des sous-unités 30S est située dans le surnageant. Dans cette expérience, les petites sous-unités ribosomiques nous sont inutiles, le surnageant est donc éliminé. Le culot est délicatement lavé par 2mL de solution à basse concentration de magnésium afin d'éliminer un maximum de sous-unités 30S contaminantes. Le culot est resuspendu dans la même solution pour atteindre une concentration de ribosomes environ égale à 600 unités de DO à 260nm /mL. Cette suspension est à nouveau traitée par deux étapes de purification sur gradient de sucrose. A la suite de ces gradients, la suspension contient encore une certaine concentration de sous-unités 30S contaminantes. Elle est alors traitée par gradient de sucrose préparatif, réalisé cette fois-ci en tube souple de polyallomère, et centrifugée à 24 000rpm (40 000g) pendant 14h. Des fractions de 1mL sont collectées à partir du fond du gradient et analysées par mesure de DO à 260nm. Les fractions contenant les sous-unités ribosomiques 50S (fractions situées dans le premier pic d'absorbance à 260nm) sont rassemblées et centrifugées à 120 000g pendant 6h. Le culot est resuspendu dans du tampon RB contenant 1mM DTT et 0,1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La concentration ribosomique est évaluée par mesure de la densité optique à 260nm (26,1 DO/ml=1pmol/ $\mu\text{L}$  50S).

#### II.1.2.12. Immobilisation des ribosomes et tests d'interactions protéiques

Des échantillons de 25 $\mu\text{L}$  de résine d'affinité anti-HA (Sigma) sont équilibrés par trois lavages successifs dans 1mL de tampon d'interaction (HEPES pH7,5 50mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10mM,  $\text{MgCl}_2$  10mM, Tween 20 0,05%). Les échantillons sont centrifugés pendant 1min à 13 000rpm entre chaque lavage et le surnageant est éliminé. Après le dernier lavage, la résine est resuspendue dans 100 $\mu\text{L}$  de tampon d'interaction. Des échantillons contenant 25pmol de sous-unités ribosomiques 50S et 25pmol des protéines d'intérêt purifiées (His<sub>6</sub>-CgtA, MBP-SpoT) sont équilibrés dans 100 $\mu\text{L}$  de tampon d'interaction durant 5 minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Ces échantillons sont centrifugés pendant 5min à 13 000rpm ( $4^\circ\text{C}$ ) afin d'éliminer les particules



insolubles et le surnageant est récupéré et mélangé à la résine anti-HA équilibrée. Les mélanges sont incubés pendant 2h à 4°C avec agitation. La résine est ensuite lavée 3 fois de la même façon que précédemment afin d'éliminer les protéines et les ribosomes non fixés. Les particules fixées à la résine sont éluées par resuspension de la résine dans 30µL de solution dénaturant pour gel SDS-PAGE (voir section II.1.2.9) et chauffage des échantillons à 95°C pendant 5min. Les échantillons sont centrifugés pendant 5min à 13000rpm et le contenu des surnageants est analysé par Western-blot, à raison de 10µL par dépôt. Des contrôles sont également effectués sans résine, afin de s'assurer que les protéines et les ribosomes ne précipitent pas, et sans ribosomes, afin de s'assurer que les protéines ne se lient pas de façon non spécifique à la résine. Si c'est le cas, la résine peut être préalablement saturée avec 10 à 15µg de BSA acétylée sans RNase. NB : cette expérience n'a pas donné de résultats (section II.5).

#### II.1.2.13. Clonages et purifications de SpoT et CgtA

Les allèles *spoT* des souches 606, NAP1 et NAP9, ainsi que l'allèle *cgtA* de 606 sont amplifiés par PCR en utilisant respectivement les couples d'amorces SpoT1bis-SpoT2bis et YhbZ3-YhbZ5 (Wout *et al.*, 2004), puis clonés dans le plasmide pCR-II TOPO selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Les inserts correspondants aux allèles *spoT* sont ensuite extraits par digestion *Bam*HI et sous-clonés dans le plasmide pMalc-2e (New England Biolabs), sous contrôle du promoteur *Ptac*, inducible par l'IPTG, permettant ainsi l'expression de protéines de fusion MBP-SpoT. Les clonages sont réalisés dans la souche hôte JM109. Le site de clonage multiple se situe entre le gène *malE*, codant la protéine MBP et le gène *lacZ*, codant la β-galactosidase. Les clones Lac<sup>-</sup>, portant un plasmide dans lequel est intégré l'insert, apparaissent blancs sur un milieu contenant du X-gal. Le sens d'intégration des inserts, ainsi que leur intégrité, sont vérifiés par digestion *Sall*-*Bam*HI et séquençage. Les protéines de fusion sont purifiées selon les recommandations du fournisseur par chromatographie d'affinité sur résine anti-MBP (NEB). L'allèle *cgtA* de 606 est extrait de pCR-II TOPO par digestion *Xho*I-*Nde*I et sous-cloné dans le plasmide pET28 (Novagen), permettant l'expression d'une protéine de fusion His<sub>6</sub>-CgtA après induction à l'IPTG. Les clonages sont réalisés dans la souche hôte BL21(DE3) et la protéine His<sub>6</sub>-CgtA est purifiée par chromatographie d'affinité sur résine d'agarose contenant du nickel (résine Ni-NTA Qiagen), selon les recommandations du fournisseur.

#### II.1.2.14. Tests d'interactions protéiques par double-hybride bactérien

Ces tests ont été réalisés par Aurelia Battesti et Emmanuelle Bouveret (LISM, Marseille). Les allèles *spoT* des souches 606, NAP1 et NAP9, ainsi que les allèles *cgtA* et *acpP* de 606 sont amplifiés par PCR en utilisant respectivement les couples d'amorces Ebm123-Ebm124, Ebm182-Ebm183 et Ebm76-Ebm77, puis clonés dans les plasmides compatibles pT25 et pT18 (Karimova *et al.*, 1998). Ceci permet l'expression des protéines CgtA, ACP et SpoT fusionnées aux fragments T25 et T18 de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*. Lorsque les fragments T25 et T18 sont en contact, soit direct, soit par l'intermédiaire de protéines de fusion qui interagissent, l'adénylate cyclase synthétise de l'AMPc qui active CRP. Cette protéine, sous forme de dimère, va à son tour activer ses gènes cibles, dont *lacZ*. La force d'interaction des deux protéines peut ainsi être déterminée par mesures d'activités  $\beta$ -galactosidase. Les plasmides pT25, dans lesquels sont clonés les allèles de *spoT*, ainsi que le plasmide pT18, dans lequel sont clonés les allèles de *cgtA* et *acp*, sont introduits dans la souche DHP1 qui comporte une inactivation du gène *cya* codant l'adénylate cyclase. Cette expérience est également réalisée de façon réciproque avec les plasmides T25-*cgtA*, T25-*acp* et T18-*spoT*. Trois cultures indépendantes des souches bactériennes sont réalisées en LB contenant de l'ampicilline et de la kanamycine à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Au bout de 12h, des mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase (voir section II.1.2.7) et de densité optique à 600nm sont effectuées sur chaque culture. La densité optique de chaque réaction enzymatique effectuée lors des mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée à 420nm et 550nm. L'activité  $\beta$ -galactosidase est exprimée en unités Miller selon la formule  $(1000 \times (DO_{420} - 1,75DO_{550})) / (T \times V \times DO_{600})$ , T représentant le temps de réaction exprimé en minutes et V, le volume réactionnel en mL (Miller, 1972). La significativité des résultats est évaluée par calcul de la déviation standard à partir des résultats obtenus en triplicatas. Le niveau d'expression des protéines SpoT ancestrale ou évoluées est évalué par Western-blot, afin de s'assurer qu'une modification d'activité  $\beta$ -galactosidase ne provient pas d'un changement de l'expression d'une des protéines.

#### II.1.2.15. Tests d'interactions protéiques par double-hybride de levure

Les allèles *spoT* ancestral et évolués sont extraits des plasmides pEB753, pEB754, pEB755 et pEB881 (voir section II.1.1.2) par double digestion *XhoI-EcoRI*. L'allèle *cgtA* de 606 est amplifié par PCR grâce aux amorces Ebm261 et Ebm183, comportant respectivement

les sites de restriction *MfeI*, compatible avec *EcoRI*, et *XhoI*. Ces différents allèles sont clonés dans les plasmides pJG4-5 et pEG202 préalablement digérés par *XhoI* et *EcoRI*. Ceci permet respectivement l'expression de protéines fusionnées au domaine activateur de transcription de la protéine B42 (B42(AD)) et au domaine de liaison à l'ADN de la protéine LexA (LexA(DBD)). Les plasmides résultant sont introduits par transformation dans deux souches de levure de type sexuel opposé, EGY48 et RFY206. Ces deux souches haploïdes peuvent fusionner pour donner une souche diploïde comportant les plasmides compatibles contenus dans chaque souche de départ. Il est ainsi possible d'exprimer dans la même souche les protéines de fusion SpoT-B42(AD) et CgtA-LexA(DBD), et réciproquement SpoT-LexA(DBD) et CgtA-B42-(AD). L'interaction entre les protéines de fusion permet la reconstitution d'un facteur de transcription actif par le rapprochement topographique des domaines de liaison à l'ADN de LexA et d'activation de la transcription de la protéine B42. Le domaine B42(AD) est également fusionné à une séquence NLS, permettant la translocation à l'intérieur du noyau. Les gènes rapporteurs *leu2* et *lacZ* peuvent alors être exprimés, leurs promoteurs comportant un site de fixation du facteur de transcription LexA. La force de l'interaction entre les deux partenaires peut donc être évaluée par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase (voir sections II.1.2.7 et II.1.2.14) ou par évaluation de la capacité des souches à pousser sur un milieu dépourvu de leucine (Kolonin *et al.*, 2000).

## II.2. Effets physiologiques des mutations du gène *spoT*

### II.2.1. Construction de souches ancestrales isogéniques, excepté pour le gène *spoT*

La souche ancêtre contenant l'allèle *spoT* mutant identifié dans la population Ara-1 (Cooper *et al.*, 2003) nous a été fourni par Tim Cooper (Université d'Auckland). Les 2 autres allèles évolués de *spoT* portant les mutations étudiées dans ce travail ont été clonés dans le plasmide-suicide pKO3. Grâce à ce vecteur, les mutations ont été introduites dans le chromosome de la souche ancêtre 606 (Ara-) par double recombinaison homologue et remplacement de l'allèle ancestral de *spoT* (voir section II.1.2.2). Nous disposons donc de 4 souches ancêtres isogéniques excepté pour le locus *spoT*. Les souches portant les allèles *spoT* des populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 (*spoT*<sup>-1</sup>, *spoT*<sup>+2</sup> et *spoT*<sup>-4</sup>) sont respectivement nommées A, NAP1 et NAP9. La souche ancêtre 606 porte l'allèle *spoT* ancestral (*spoT*<sup>anc</sup>). Ceci permet d'étudier de façon isolée chaque allèle du gène *spoT*, hors des contextes évolués

dans lesquels d'autres mutations sont apparues. De cette façon, les différences phénotypiques observées entre les souches 606 et A, NAP1 ou NAP9 peuvent être exclusivement attribués aux allèles évolués de *spoT*.

### **II.2.2. Dynamique d'invasion des mutations *spoT***

Le stade de l'évolution auquel sont apparues les mutations *spoT* ainsi que la vitesse à laquelle elles ont envahi leur population respective ont été évalués. Le gène *spoT* a été amplifié par PCR chez un certain nombre de clones évolués isolés à 500, 1000 et 1500 générations dans les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4, puis les produits PCR ont été digérés afin de distinguer les allèles ancestral et évolués de *spoT*. En effet, les allèles *spoT<sup>anc</sup>* (c'est-à-dire l'allèle *spoT* de 606) et *spoT<sup>evol</sup>* (c'est-à-dire les allèles *spoT* des populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4) diffèrent par leur profil de restriction, les mutations ayant créé ou éliminé un site de restriction. Dans la population Ara-1, aucun clone sur la centaine analysée ne porte la mutation *spoT* à 500 générations, tandis qu'à 1000 et 1500 générations, respectivement 41 et 98 clones sur 100 portent la mutation (Cooper *et al.*, 2003). La mutation de la population Ara-1 est donc apparue entre 500 et 1000 générations et a été fixée à 1500 générations. Les mutations *spoT* des populations Ara+2 et Ara-4 sont apparues et ont envahi leur population avant 500 générations. En effet, sur 25 clones isolés dans les deux populations à 500 générations, tous présentent l'allèle *spoT* évolué correspondant. Il faut noter que nous ne disposons pas d'échantillons des 12 populations avant 500 générations. Ces trois mutations ont donc été fixées de façon précoce et indépendante durant la période de forte augmentation de fitness. Ceci suggère fortement un rôle adaptatif de ces mutations. Il est probable qu'elles apportent un bénéfice aux bactéries dans les conditions de l'évolution expérimentale. La réponse stringente est donc une des premières cibles de la sélection naturelle au cours de l'évolution expérimentale. Pour tester ceci, nous avons évalué l'impact de ces mutations sur le fitness des bactéries.

### **II.2.3. Effets des mutations *spoT* sur le fitness des bactéries dans le milieu de l'évolution**

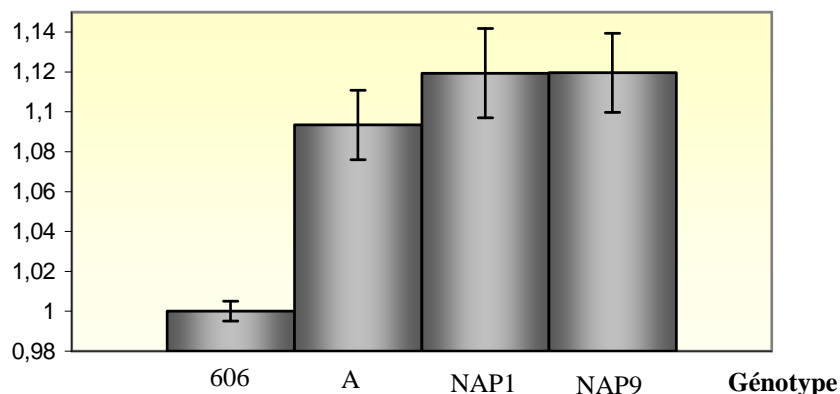
Le fitness, c'est-à-dire la capacité de reproduction des bactéries, est mesuré grâce à des expériences de compétition. Les différentes souches (les trois souches mutantes A, NAP1 et NAP9, les souches ancêtres 606 (Ara-) et 607 (Ara+)) sont cultivées de façon indépendante

en milieu minimum glucose DM1000 (0,1% de glucose), afin d'obtenir une concentration bactérienne élevée. Puis ces cultures sont diluées au 1/10 000<sup>ème</sup> en DM25 (0,0025% de glucose), le milieu de l'évolution, dans lequel elles s'acclimatent pendant 24h à 37°C. Les compétitions consistent ensuite à mettre en co-culture en DM25 les souches porteuses des mutations d'intérêt et l'ancêtre de marqueur arabinose opposé, en proportions équivalentes (dilution 1/200) (Fig.25, section II.1.2.3). Dans notre cas, cela signifie que les souches A, NAP1 et NAP9, qui sont incapables d'utiliser l'arabinose comme source de carbone, sont mises en compétition contre la souche ancêtre 607, révertant Ara<sup>+</sup> de 606. Les co-cultures sont étalées sur milieu TA, permettant de distinguer les compétiteurs, au moment du mélange et après 24h d'incubation et donc de compétition. Les proportions des différents compétiteurs sont évaluées par comptage des deux types de colonies (Ara<sup>+</sup> et Ara<sup>-</sup>), ce qui permet de déterminer la proportion relative des deux compétiteurs. Les valeurs de fitness sont déterminées par le rapport des taux de croissance des deux compétiteurs. Les deux ancêtres 606 et 607 sont également mis en compétition l'un contre l'autre afin de confirmer le caractère neutre du marqueur arabinose dans les conditions utilisées. Toutes les expériences de compétition sont réalisées 6 fois de façon indépendante. La significativité des résultats a été évaluée grâce à un test statistique de Student.

Afin de s'assurer que le fitness des différentes souches n'est pas dû à l'apparition artéfactuelle d'une mutation secondaire lors des constructions de souches mutantes, toutes les souches portant les allèles évolués de *spoT* ont également été « déconstruites ». Cela signifie que les allèles évolués introduits dans le chromosome de l'ancêtre ont été à nouveau remplacés par l'allèle ancestral, toujours à l'aide du vecteur-suicide pKO3. Les mesures de fitness des souches « déconstruites » doivent être équivalentes à celle de la souche ancêtre pour valider l'expérience. Ceci permet de confirmer que le fitness mesuré chez les souches portant les allèles évolués de *spoT* est spécifiquement dû à la présence de ces allèles.

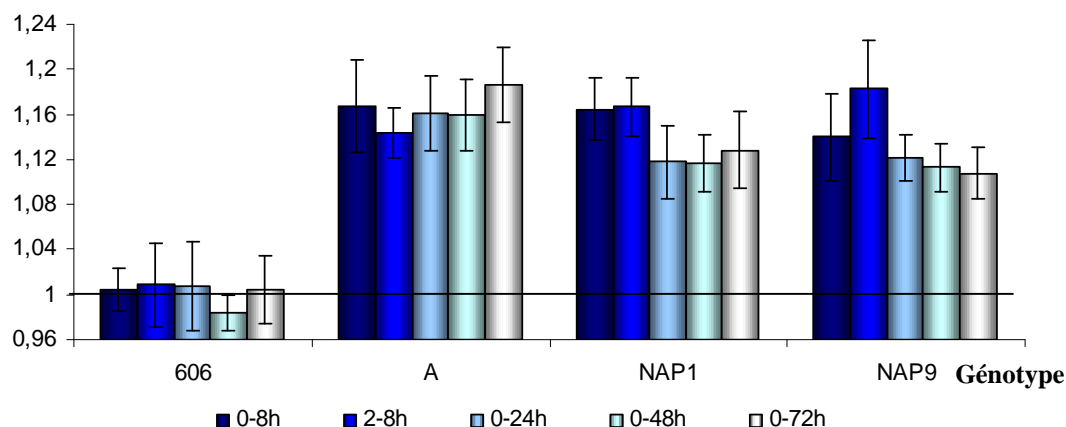
Le fitness des souches Ara<sup>-</sup> 606, A (606 *spoT*<sup>-1</sup>), NAP1 (606 *spoT*<sup>+2</sup>) et NAP9 (606 *spoT*<sup>-4</sup>) a été mesuré par rapport à l'ancêtre Ara<sup>+</sup> 607. Les trois souches portant les allèles évolués de *spoT* présentent un fitness environ 10 à 12% supérieur à celui de l'ancêtre 606 (606 :  $f=1,0058$ ,  $H_0=1$ ,  $n=20$ ,  $ts=1,516$ ,  $p=0,146$  ; A :  $f=1,0935$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=10,53$ ,  $p=0,0001$  ; NAP1 :  $f=1,1195$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=10,52$ ,  $p=0,0001$  ; NAP9 :  $f=1,1196$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=11,79$ ,  $p=0,0001$  (NB :  $f$  : fitness,  $H_0$  : hypothèse nulle du test de Student,  $n$  : nombre de réplicats,  $ts$  : test statistique,  $p$  : valeur de probabilité (intervalle de confiance de 95%))) (Fig.30). Cela confirme le résultat obtenu pour la mutation de la population Ara-1 (Cooper *et*

**Fitness relatif  
par rapport au  
clone ancêtre 607**



**Figure 30 : Effets des mutations du gène *spoT* sur le fitness des bactéries dans le contexte génétique de l'ancêtre.** Le fitness a été mesuré grâce à des expériences de compétition de 24h dans lesquelles les souches d'intérêt (606 portant différents allèles de *spoT*) ont été mises en co-culture avec l'ancêtre de marqueur arabinose opposé (607) (voir fig.26). Les compétitions ont été réalisées dans les conditions de l'évolution expérimentale, c'est-à-dire en milieu DM25 glucose. Le marqueur arabinose n'influence pas le fitness des bactéries dans ces conditions (voir histogramme de gauche : compétition 606 contre 607, fitness = 1). Ici, les deux compétiteurs diffèrent seulement par l'allèle *spoT* et le marqueur arabinose, ce qui permet d'évaluer le bénéfice apporté par les mutations *spoT*. La valeur de fitness est calculée en effectuant le rapport des taux de croissance des deux compétiteurs. 607 : ancêtre Ara+ portant l'allèle ancestral de *spoT*, 606 : ancêtre Ara- portant l'allèle ancestral de *spoT*, A : 606 portant l'allèle *spoT* de la population Ara-1, NAP1 : 606 portant l'allèle *spoT* de la population Ara+2, NAP9 : 606 portant l'allèle *spoT* de la population Ara-4. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% basés sur des compétitions réalisées en 6 exemplaires pour chaque génotype.

**Fitness relatif  
par rapport au  
clone ancêtre 607**



**Figure 31 : Effets des mutations *spoT* sur le fitness des bactéries en fonction des phases de croissance.** Le fitness des différentes souches a été mesuré par des compétitions dans les conditions de l'évolution expérimentale (DM25 glucose) après 2h, 8h, 24h, 48h et 72h de co-cultures. Les mutations apportent un bénéfice considérable pendant les 8 premières heures, correspondant à la phase de croissance exponentielle. Elles n'apportent pas d'avantage supplémentaire pendant les deux premières heures de co-culture correspondant à la phase de latence, ni en phase stationnaire. Les temps auxquels ont été effectués les prélèvements sont indiqués par le code couleur.

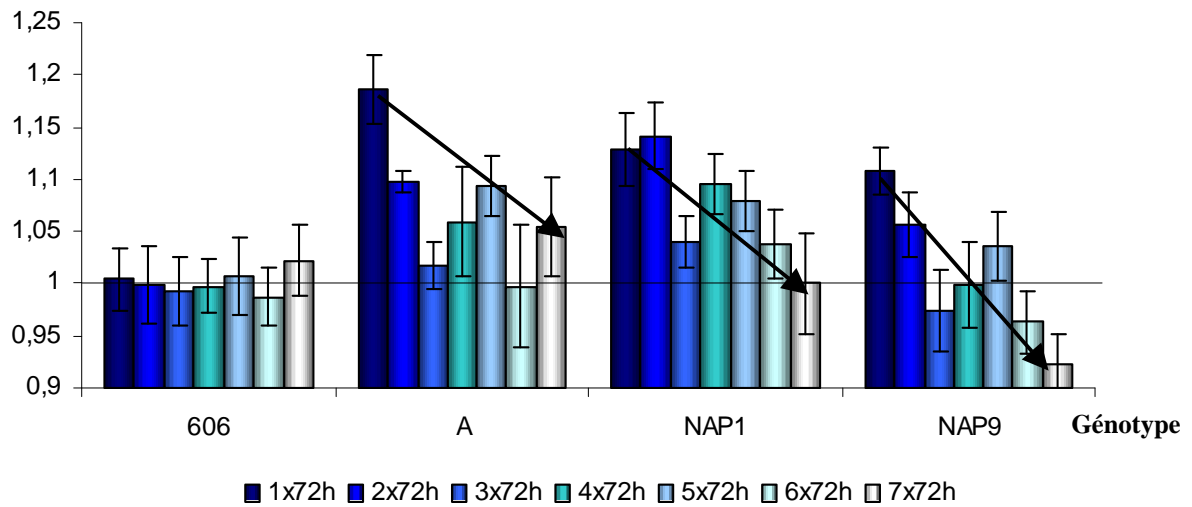
al., 2003). Les deux autres mutations du gène *spoT* étudiées apportent donc un bénéfice équivalent à cette mutation dans les conditions de l'évolution expérimentale. Ainsi l'évolution génétique parallèle du locus *spoT* dans les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 a des conséquences phénotypiques parallèles sur l'accroissement de fitness.

Afin de déterminer la phase de croissance pendant laquelle les mutations apportent un tel avantage, le fitness des bactéries a été mesuré à différents stades des co-cultures. Des compétitions ont été effectuées de la même façon que précédemment, mais des échantillons ont été prélevés à différents temps de compétition : après 2h de co-culture, ce qui correspond à la fin de la phase de latence, après 8h de co-culture, c'est-à-dire en fin de phase de croissance exponentielle, et en phase stationnaire après 24h, 48h et 72h de co-culture. Le fitness des différentes souches a été calculé entre 2h et 8h, comprenant uniquement la phase de croissance exponentielle, entre 0h et 8h, ce qui inclut la phase de latence et la phase exponentielle et entre 0 et 24h, ce qui comprend les trois phases de la croissance bactérienne. Le fitness a également été calculé après 48h et 72h de co-culture afin d'évaluer l'effet des mutations en phase stationnaire prolongée, conditions que les bactéries ne rencontrent pas au cours de l'évolution expérimentale (Fig.31).

Les différentes mutations apportent un avantage conséquent dès 8h de culture. Le bénéfice apporté par les mutations pendant la phase de croissance exponentielle, entre 2h et 8h de culture, est équivalent à l'avantage observé entre 0 et 8h. Les mutations n'apportent donc pas de bénéfice détectable en phase de latence, durant les deux premières heures de culture. D'autre part, les mutations n'apportent pas de bénéfice supplémentaire en phase stationnaire, après 8h de culture (Fig.31). Les mutations identifiées dans *spoT* apportent donc un avantage spécifique de la phase de croissance exponentielle, probablement en augmentant le taux de croissance des bactéries.

Bien que les résultats obtenus ne soient pas statistiquement significatifs (Fig.31), les souches ancestrales possédant les allèles évolués de *spoT* des populations Ara+2 et Ara-4 (NAP1 et NAP9) semblent révéler un fitness moins important en phase stationnaire prolongée. Nous avons cherché à savoir si cela représentait la réalité ou était le reflet d'un artefact. Pour ce faire, nous avons réalisé une nouvelle expérience d'évolution expérimentale au cours de laquelle les bactéries ont été adaptées à des périodes de carence plus importantes. Dans la stratégie initiale d'évolution expérimentale, la période de latence et la phase exponentielle ne représentent environ que 7 à 8h du cycle de culture de 24h, la phase stationnaire s'étend donc sur environ 17h. Nous avons réalisé des expériences au cours

**Fitness relatif par  
rapport au clone  
ancêtre 607**



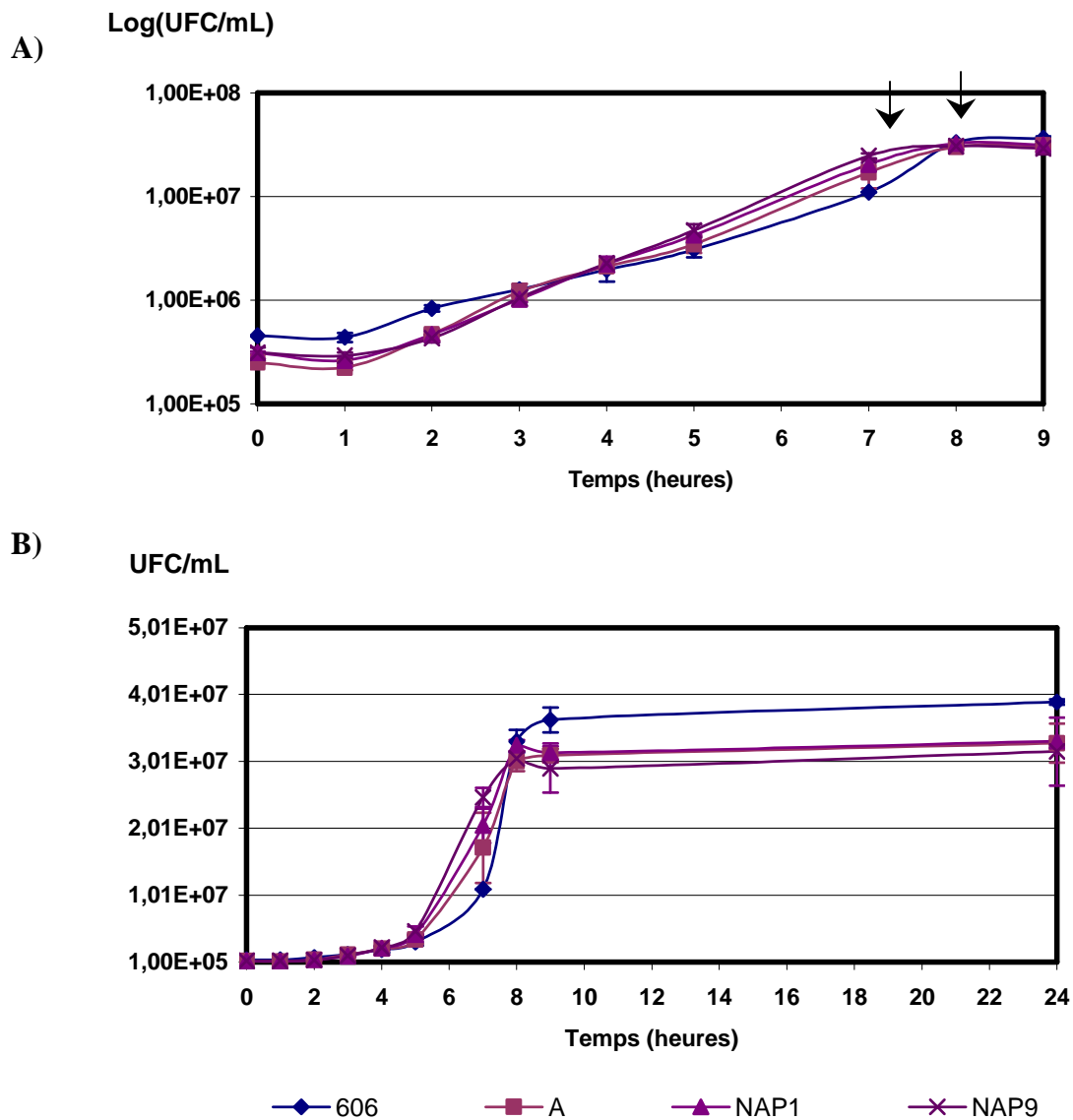
**Figure 32 : Effets des mutations *spoT* sur le fitness des bactéries lors d'une expérience d'évolution au cours de laquelle les bactéries rencontrent une phase stationnaire prolongée (DM25 glucose).** Des co-cultures de 607 (*spoT<sup>anc</sup>* Ara+) et de chacune des souches ancestrales Ara- 606 (*spoT<sup>anc</sup>*), A (*spoT<sup>-1</sup>*), NAP1 (*spoT<sup>+2</sup>*), NAP9 (*spoT<sup>-4</sup>*) ont été réalisées pendant des cycles de 72h en milieu DM25 glucose. Entre chaque cycle, les co-cultures ont été diluées au 1/100<sup>ème</sup> dans du milieu frais. Sept cycles de culture ont été effectués. A la fin de chaque cycle, les populations ont été diluées et étalées sur TA, ce qui a permis de calculer le fitness de chacune des souches en présence. Le code couleur indique le nombre de cycles de culture.



desquelles la phase stationnaire représente cette fois environ 64h à chaque cycle de culture. D'autre part, au lieu de propager l'ancêtre seul, comme précédemment, nous avons fait évoluer des co-cultures entre l'ancêtre Ara+ 607 portant l'allèle ancestral de *spoT* et chacun des ancêtres Ara- portant un allèle évolué de *spoT* (A, NAP1, NAP9). L'« ancêtre » est donc ici un mélange de deux souches différant par l'allèle de *spoT* et la capacité à utiliser l'arabinose comme source de carbone. Ces co-cultures ont alors été soumises à des cycles de croissance de 72h en milieu DM25 glucose, avec des transferts réalisés par dilution 1/100 dans du milieu frais. Sept cycles de cultures ont été réalisés. A chaque repiquage, les cultures ont été diluées et étalées sur TA et le fitness des souches présentes dans ces co-cultures a été calculé (Fig.32). Une co-culture contrôle a été réalisée par mélange des deux ancêtres Ara+ (607) et Ara- (606). Au cours des différents cycles de co-culture, le fitness de ces deux souches ne varie pas et reste égal à 1 (Fig.32). Ceci signifie que le marqueur arabinose est neutre dans ces conditions et qu'aucune mutation à effet bénéfique important n'a été fixée dans l'une ou l'autre de ces souches au cours de cette expérience. Ce qui est observé pour les autres co-cultures est donc vraisemblablement spécifique des mutations *spoT*. A la fin du premier cycle de culture, les différentes souches mutantes présentent un bénéfice important, équivalent à celui mesuré précédemment. Au fur et à mesure des repiquages, le fitness des mutants diminue, tombant même à une valeur inférieure à 1 pour la souche NAP9 (Fig.32). Il est donc probable que les mutations *spoT* procurent un « fardeau génétique » en phase stationnaire prolongée dans des conditions de compétition directe avec l'ancêtre. De plus, le bénéfice important apporté par les mutations en phase exponentielle à chaque cycle de culture n'est pas suffisant pour contrer l'effet délétère observé en phase stationnaire prolongée. Une fois de plus, les trois mutations présentent des effets équivalents suggérant une évolution moléculaire parallèle. Ceci explique également la fixation des mutations *spoT* dans la stratégie d'évolution expérimentale initiale, dans laquelle la phase stationnaire est courte. Dans ces conditions, l'effet bénéfique apporté en phase exponentielle est donc prédominant et n'est pas contre-balançé par un effet néfaste en phase stationnaire prolongée.

#### **II.2.4. Effets des mutations *spoT* sur la croissance bactérienne en milieu DM25 glucose**

Afin de confirmer l'effet bénéfique des mutations en phase de croissance exponentielle, les caractéristiques phénotypiques de la croissance des différentes souches ont été analysées en milieu DM25 glucose. Le milieu DM25 contenant une très faible



**Figure 33 : Caractéristiques de croissance des souches porteuses des allèles ancestraux et évolués de *spoT* en milieu DM25 glucose, le milieu de l'évolution.** Les souches 606, A, NAP1 et NAP9 ont été cultivées en milieu DM25 glucose. Des prélèvements ont été effectués à intervalles de temps réguliers, dilués et étalés sur LB-agar. La concentration cellulaire des cultures a ainsi été déterminée en fonction du temps. **A) Croissance des différentes souches exprimée en log(UFC/mL) en fonction du temps.** Les souches portant les allèles évolués de *spoT* présentent une vitesse de croissance supérieure à l'ancêtre ainsi qu'un passage précoce en phase stationnaire. Les flèches signalent le passage en phase stationnaire des différentes souches. **B) Croissance des différentes souches exprimée en UFC/mL en fonction du temps.** Les cultures des souches mutantes comportent une densité cellulaire plus faible que l'ancêtre en phase stationnaire.

concentration de glucose (0,14mM), la croissance bactérienne y est faible, aboutissant à des concentrations de l'ordre de  $3 \text{ à } 5.10^7$  UFC/mL. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la concentration cellulaire à intervalles de temps réguliers. Comme pour les mesures de fitness, des cultures de nuit en DM1000 des souches 606, A, NAP1 et NAP9 ont été diluées au  $1/10\,000^{\text{ème}}$  dans du milieu DM25, puis acclimatées pendant 24h à 37°C. Le lendemain, les cultures ont été diluées au  $1/100^{\text{ème}}$  dans du milieu frais, puis des échantillons ont été prélevés toutes les heures, dilués et étalés sur des boîtes de LB-agar. Chaque culture a été réalisée en double. Un comptage des colonies a permis de définir la trajectoire de croissance des différentes souches dans le milieu de l'évolution (Fig.33). La durée de la phase de latence ne semble pas modifiée dans les souches mutantes par rapport à l'ancêtre. Ceci va à l'encontre de ce qui avait été observé par Cooper *et al.* (2003) qui suggéraient une réduction de cette phase dans le mutant A. Cependant, cela confirme le fait qu'aucun bénéfice associé à cette phase n'ait pu être mesuré (Figs.31 et 33). D'autre part, les trois souches mutantes présentent une vitesse de croissance nettement plus élevée que la souche ancêtre (Fig.33A, Tableau 3). En effet, le temps de génération environ égal à une heure chez l'ancêtre est réduit de façon très importante, environ 30%, chez les mutants pour atteindre environ 40min (Tableau 3). Cela reflète également le fort bénéfice (environ 10%) conféré par les mutations *spoT* et mesuré lors des expériences de compétition (Fig.30). Les mutations permettent donc d'améliorer le taux de croissance des bactéries en milieu minimum glucose. Enfin, la durée de la phase de croissance exponentielle est plus courte chez les mutants, ce qui est probablement dû à l'épuisement plus rapide de la source de carbone. La transition vers la phase stationnaire se produit donc de façon précoce chez les mutants par rapport à l'ancêtre (Fig.33A), ce qui est également observé chez les clones évolués au sein de 12 populations (Vasi et Lenski, 1994). De plus, lors de leur passage en phase stationnaire, les cultures des mutants présentent un nombre de cellules réduit par rapport à l'ancêtre (Fig.33B). Alors que l'ancêtre entre en phase stationnaire avec une concentration cellulaire environ égale à  $3,8.10^7$  UFC/mL, les cultures des mutants ne contiennent que  $3.10^7$  UFC/mL, soit 20% de cellules en moins.

#### **II.2.5. Effets des mutations *spoT* sur la croissance bactérienne dans d'autres environnements**

Afin de déterminer si le bénéfice conféré par les mutations *spoT* est spécifique des conditions de l'évolution expérimentale, les phénotypes associés aux mutations *spoT* (fitness, temps de génération, ...) ont été étudiés dans 3 autres environnements : DM25 glycérol,

Temps de génération	DM25 glucose	DM25 glycérol	MOPS medium
<b>606</b>	<b>55 min</b>	<b>1h 12 min</b>	<b>1h 15 min</b>
<b>A</b> (606 <i>spoT</i> <sup>-1</sup> )	<b>40 min</b> (-28%)	ND	ND
<b>NAP1</b> (606 <i>spoT</i> <sup>+2</sup> )	<b>37 min</b> (-33%)	<b>55 min</b> (-24%)	<b>1h 00 min</b> (-20%)
<b>NAP9</b> (606 <i>spoT</i> <sup>-4</sup> )	<b>37 min</b> (-33%)	ND	ND

**Tableau 3 : Temps de génération de l'ancêtre 606 *spoT*<sup>anc</sup> et des souches 606 *spoT*<sup>évol</sup> mesurés en phase de croissance exponentielle en milieu DM25 glucose (2<sup>ème</sup> colonne). Deux autres milieux de culture ont été testés pour 606 et NAP1. ND : non déterminé. Les pourcentages de diminution du temps de génération par rapport à 606 sont donnés entre parenthèses.**

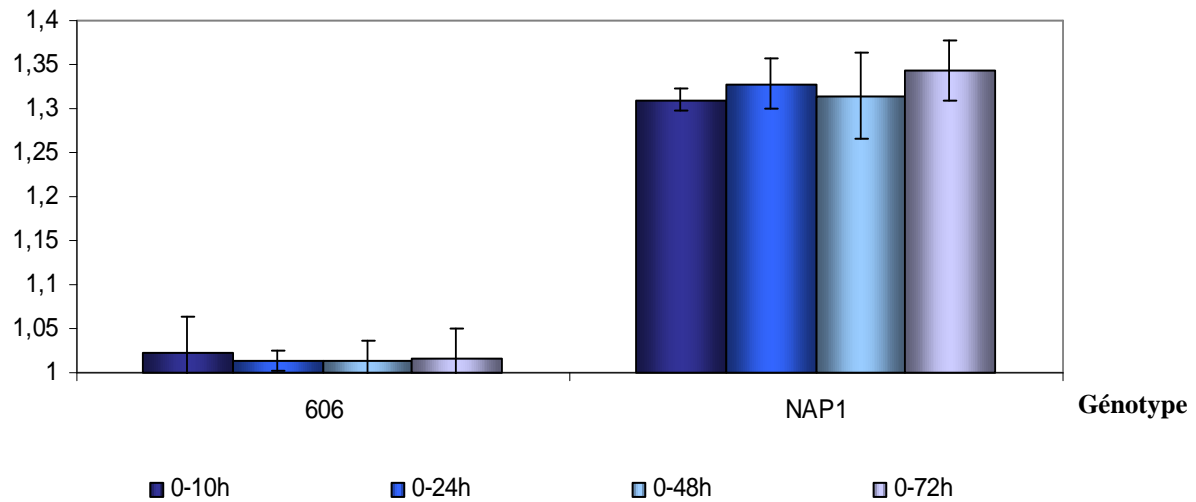
Fitness relatif par rapport à 607	DM25 glucose	DM25 glycérol	DM25 maltose	MOPS glucose
<b>606</b> ( <i>spoT</i> <sup>anc</sup> )	<b>f=1,0058</b> <i>p</i> =0,146	<b>f=1,0135</b> <i>p</i> =0,0922	<b>f=1,00005</b> <i>p</i> =0,993	<b>f=1,0111</b> <i>p</i> =0,2621
<b>A</b> (606 <i>spoT</i> <sup>-1</sup> )	<b>f=1,0935</b> <i>p</i> =0,0001	ND	<b>f=1,1316</b> <i>p</i> =0,0006	ND
<b>NAP1</b> (606 <i>spoT</i> <sup>+2</sup> )	<b>f=1,1195</b> <i>p</i> =0,0001	<b>f=1,3227</b> <i>p</i> =4,6.10 <sup>-6</sup>	<b>f=1,1078</b> <i>p</i> =0,0001	<b>f=1,1073</b> <i>p</i> =0,0021
<b>NAP9</b> (606 <i>spoT</i> <sup>-4</sup> )	<b>f=1,1196</b> <i>p</i> =0,0001	ND	<b>f=1,0988</b> <i>p</i> =0,014	ND

**Tableau 4 : Fitness relatif de l'ancêtre 606 portant l'allèle ancestral ou chacun des trois allèles évolués de *spoT* par rapport à l'ancêtre 607 mesuré dans différents milieux de culture. L'effet sur le fitness des mutations *spoT* apparues dans les populations Ara-1 et Ara-4 a été testé en DM25 maltose. L'effet de la mutation *spoT* apparue dans la population Ara+2 a été testé en DM25 glycérol, DM25 maltose et milieu MOPS glucose. Les valeurs de fitness obtenues en milieu DM25 glucose ont été indiquées par comparaison dans la colonne de gauche. Le marqueur arabinose est neutre dans toutes les conditions. f : valeur de fitness, *p* : valeur de probabilité (Test statistique de Student, intervalle de confiance = 95%, hypothèse nulle = 1), ND : non déterminé.**

DM25 maltose et milieu minimum MOPS glucose. Le choix des sources de carbone est basé sur leurs mécanismes de transport, qui sont différents. Ainsi le glucose et le glycérol traversent préférentiellement la membrane externe par la porine OmpF, tandis que le maltose induit l'expression de la protéine LamB, par laquelle il entre dans le périplasme. Le glucose pénètre dans le cytoplasme via le système PTS-glucose, tandis que le glycérol traverse la membrane plasmique par diffusion facilitée grâce au facilitateur codé par *glpF* (Lin, 1996). Le maltose est, quant à lui, pris en charge par un système transporteur de type ABC codé par les gènes *malE*, *malF*, *malG* et *malK* (Lin, 1996). Le milieu MOPS glucose est utilisé lors des mesures de métabolisme de (p)ppGpp (voir section II.3.1). Hormis une concentration de glucose beaucoup plus importante (0,2% de glucose), ce milieu présente une composition très différente du DM25. Il contient entre autres tous les oligo-éléments nécessaires à la croissance cellulaire et beaucoup moins de phosphate que le milieu DM.

L'effet de chacune des 3 mutations sur le fitness a été testé dans le milieu DM25 maltose, alors que seule la mutation *spoT* mise en évidence dans la population Ara+2 a été testée dans les milieux DM25 glycérol et MOPS glucose (Tableau 4). Dans les 3 environnements, nous avons pu démontrer la neutralité, et donc l'utilité du marqueur arabinose (606 : DM25 maltose :  $f=1,00005$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=0,0092$ ,  $p=0,993$  ; DM25 glycérol :  $f=1,0135$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=2,079$ ,  $p=0,0922$  ; MOPS glucose :  $f=1,0111$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=1,2634$ ,  $p=0,2621$ ). Dans tous les cas, les mutations *spoT* confèrent un avantage similaire à ce qui a été mesuré milieu DM25 glucose (Tableau 4) (DM25 maltose : A :  $f=1,1316$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=7,81$ ,  $p=0,0006$ , NAP1 :  $f=1,1078$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=12,18$ ,  $p=0,0001$ , NAP9 :  $f=1,0988$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=6,39$ ,  $p=0,014$  ; DM25 glycérol : NAP1 :  $f=1,3227$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=20,86$ ,  $p=4,6 \cdot 10^{-6}$  ; MOPS glucose : NAP1 :  $f=1,1073$ ,  $H_0=1$ ,  $n=5$ ,  $ts=7,075$ ,  $p=0,0021$ ). Toutefois, en milieu DM25 glycérol, la mutation *spoT* de la population Ara+2 confère un bénéfice 3 fois plus important que ce qui est observé dans les autres environnements (Tableau 4). Une analyse plus détaillée des phénotypes associés à la mutation *spoT* de la population Ara+2 a été réalisée en milieu DM25 glycérol, de la même façon que précédemment (sections II.2.3, II.2.4). L'effet sur le fitness a notamment été disséqué en fonction des phases de croissance (phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire) (Fig.34). Des expériences de compétitions ont été réalisées avec des prélèvements en fin de phase de latence (2h) et de phase de croissance exponentielle (10h), ainsi qu'en phase stationnaire (24 et 48h) (Fig.34). De la même façon qu'en milieu DM25 glucose, le bénéfice apporté par la mutation *spoT* de la population Ara+2 est spécifique de phase de croissance exponentielle, comprise entre 2 et 10h. La mutation n'apporte pas d'avantage supplémentaire en phase de latence (0-2h), ni en

**Fitness relatif par  
rapport l'ancêtre 607**



**Figure 34 : Effet de la mutation *spoT* de la population Ara+2 sur le fitness des bactéries en milieu DM25 glycérol selon les phases de croissance.** Les souches 606 (*spoT*<sup>anc</sup>) et NAP1 (*spoT*<sup>+2</sup>) ont été mises en compétition contre la souche 607 en milieu DM25 glycérol. Le fitness des différentes souches a été mesuré après 10h, 24h, 48h et 72h de co-cultures. Les temps auxquels ont été effectués les prélèvements sont indiqués par le code couleur.

phase stationnaire (10-48h). Ce bénéfice est donc probablement lié à une augmentation du taux de croissance, ce qui a été testé par des mesures de la croissance en milieu DM25 glycérol, réalisées de la même façon qu'en milieu DM25 glucose. La mutation *spoT* de la population Ara+2 n'a pas d'effet sur la durée de la phase de latence (résultat non montré), mais elle entraîne une diminution du temps de génération de près de 25% (Tableau 3), similaire à ce qui avait été observé en milieu DM25 glucose. Le fait qu'elle apporte un bénéfice 3 fois supérieur en milieu DM25 glycérol par rapport au milieu DM25 glucose ne peut donc pas être expliqué par un effet plus important sur la vitesse de division des bactéries en milieu DM25 glycérol. Comme dans le milieu de l'évolution expérimentale, la souche NAP1 présente également une transition précoce en phase stationnaire par rapport à l'ancêtre (résultat non montré).

Les mutations *spoT* des populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 confèrent donc un bénéfice important aux bactéries quel que soit l'environnement étudié. Malgré le fait qu'elles aient été sélectionnées en milieu minimum glucose, elles permettent l'adaptation des bactéries dans d'autres conditions de croissance. Les mutations semblent apporter un bénéfice exclusivement durant la phase de croissance exponentielle, ce qui est confirmé par les mesures de temps de génération des différentes souches, les mutations entraînant une augmentation importante de la vitesse de division des cellules. D'autre part, les mutations *spoT* affectent de façon importante le comportement des cellules lors des transitions entre la phase de croissance exponentielle et la phase stationnaire. Les souches mutantes A, NAP1 et NAP9 entrent en phase stationnaire plus rapidement que la souche ancêtre dans tous les milieux testés.

Nous avons ensuite cherché à caractériser les mécanismes par lesquels les mutations *spoT* permettent aux bactéries de s'adapter aux conditions de l'évolution expérimentale. La protéine SpoT, en combinaison avec RelA, jouant un rôle central dans l'adaptation des bactéries aux transitions croissance-carence en modulant la concentration intracellulaire de (p)ppGpp, nous avons étudié les effets des différentes mutations sur le métabolisme de (p)ppGpp.

		AT (10-20mM)	M9 0,2% glucose	
			+	-
			casaminoacides	casaminoacides
<i>relA</i> <sup>+</sup>	606	AT <sup>R</sup>	+	+
	606 <i>spoT</i> <sup>-1</sup>	AT <sup>R</sup>	+	+
	606 <i>spoT</i> <sup>+2</sup>	AT <sup>R</sup>	+	+
	606 <i>spoT</i> <sup>-4</sup>	AT <sup>R</sup>	+	+
<i>ΔrelA</i>	606	AT <sup>S</sup>	+	+
	606 <i>spoT</i> <sup>-1</sup>	AT <sup>S</sup>	+	+
	606 <i>spoT</i> <sup>+2</sup>	AT <sup>S</sup>	+	+
	606 <i>spoT</i> <sup>-4</sup>	AT <sup>S</sup>	+	+

**Tableau 5 : Effets des mutations *spoT* sur le métabolisme de (p)ppGpp : tests phénotypiques de croissance des souches *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta$ *relA* portant les allèles *spoT* ancestral et évolués.** AT : milieu comportant de l'aminotriazole (AT), inhibiteur de la biosynthèse de l'histidine, créant ainsi une carence en histidine. (p)ppGpp activant la biosynthèse de l'histidine, seules les souches synthétisant suffisamment de (p)ppGpp peuvent survivre sur ce milieu. Dans un contexte *relA*<sup>+</sup>, toutes les souches poussent sur un milieu contenant jusqu'à 20mM d'AT (AT<sup>R</sup> : résistantes à l'AT). Dans un contexte  $\Delta$ *relA*, au dessus de 5mM d'AT, aucune croissance n'est détectée pour les 4 souches (AT<sup>S</sup> : sensibles à l'AT). **M9 glucose +/- casaminoacides** : les souches ne synthétisant pas de (p)ppGpp sont auxotrophes et ne poussent pas sans acides aminés. La croissance sur le milieu minimum sans casaminoacides reflète de manière indirecte le niveau intracellulaire de (p)ppGpp. + signifie qu'une croissance est observée. NB : La croissance des colonies est légèrement plus faible dans un contexte  $\Delta$ *relA* avec ou sans casaminoacides. Aucune différence notable n'est observée entre la souche *spoT*<sup>anc</sup> et les souches *spoT*<sup>évol</sup>.



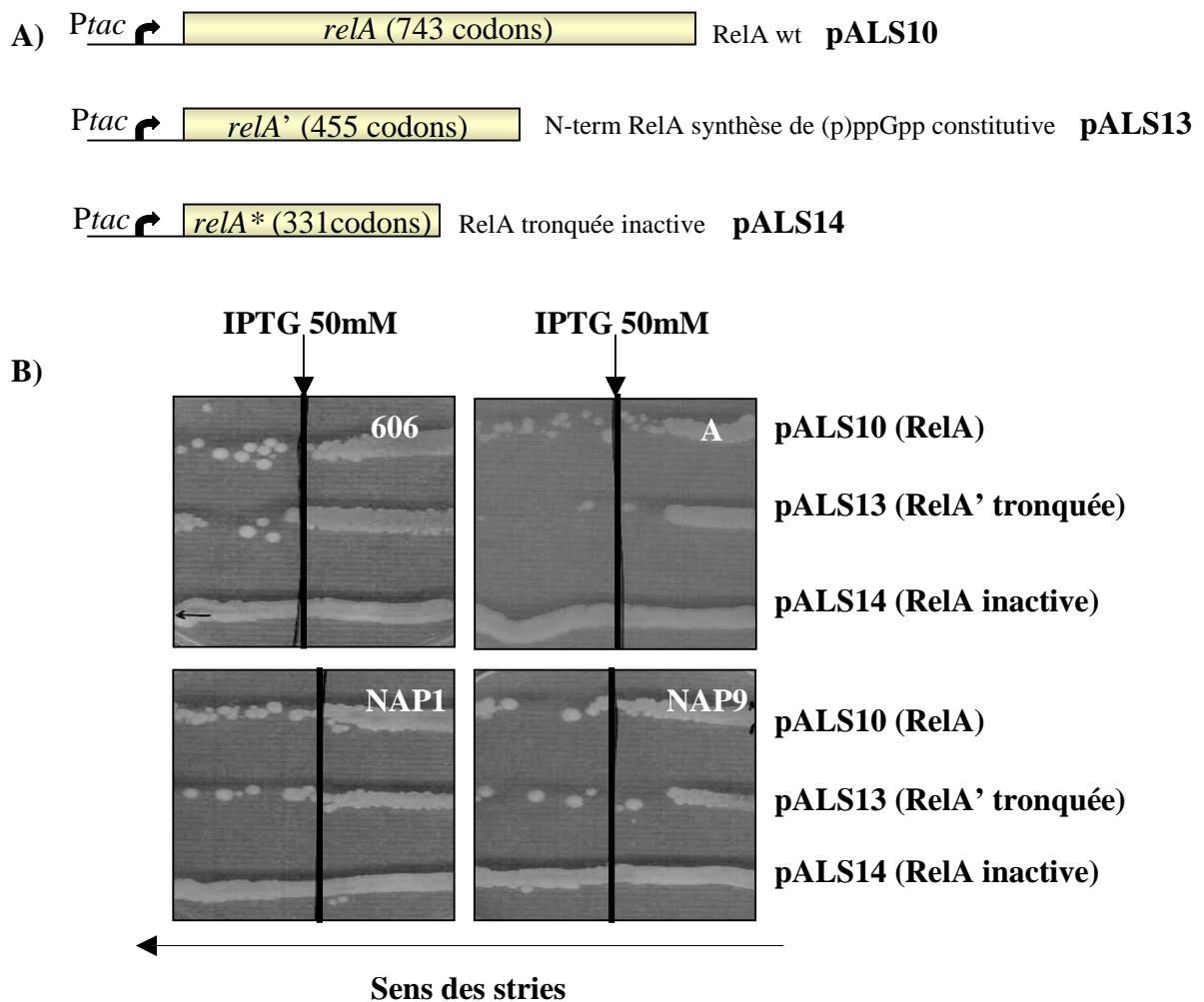
## II.3. Effets des mutations *spoT* sur le métabolisme de (p)ppGpp et l'expression de ses gènes cibles

### II.3.1. Effets des mutations *spoT* sur le métabolisme de (p)ppGpp

#### II.3.1.1. Tests phénotypiques

Les souches dépourvues de (p)ppGpp sont incapables de se développer sur un milieu minimum dépourvu d'acides aminés ou contenant de l'aminotriazole, qui provoque une carence en histidine par inhibition de sa biosynthèse (Rudd *et al.*, 1985). (p)ppGpp activant l'expression des gènes de biosynthèse d'acides aminés dont l'histidine, un niveau de (p)ppGpp suffisant permet donc aux bactéries de pousser sur ces milieux en contrant les effets de l'aminotriazole ou de l'absence d'acides aminés (Cashel *et al.*, 1996). Ces deux types de milieux peuvent donc permettre d'évaluer de façon simple et rapide la concentration intracellulaire de (p)ppGpp des bactéries en se basant sur la croissance des colonies. Les mutations étudiées ici ciblant le domaine régulateur de la protéine SpoT, il est probable qu'elles aient des effets plutôt subtils sur le métabolisme de (p)ppGpp. Ces effets pourraient être plus facilement détectables dans un contexte où le niveau de (p)ppGpp est faible. Les différentes mutations ont alors été introduites au moyen du plasmide suicide pKO3 dans le contexte génétique ancestral dépourvu du gène *relA* ( $\Delta relA$ ). Une délétion du gène *relA* diminue en effet de façon importante la concentration intracellulaire de (p)ppGpp puisque la protéine RelA constitue sa principale source de biosynthèse. L'effet des mutations *spoT* sur la croissance des bactéries a été étudié dans les deux contextes génétiques *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta relA$ . Les différentes souches *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta relA$ , portant les allèles ancestral et évolués de *spoT*, ont été cultivées en milieu DM250 glucose puis étalées sur deux types de milieux : un milieu solide contenant 0, 5, 10, 15 ou 20mM d'aminotriazole et un milieu minimum glucose (0,2%) supplémenté ou non en casaminoacides (0,2%) (Tableau 5).

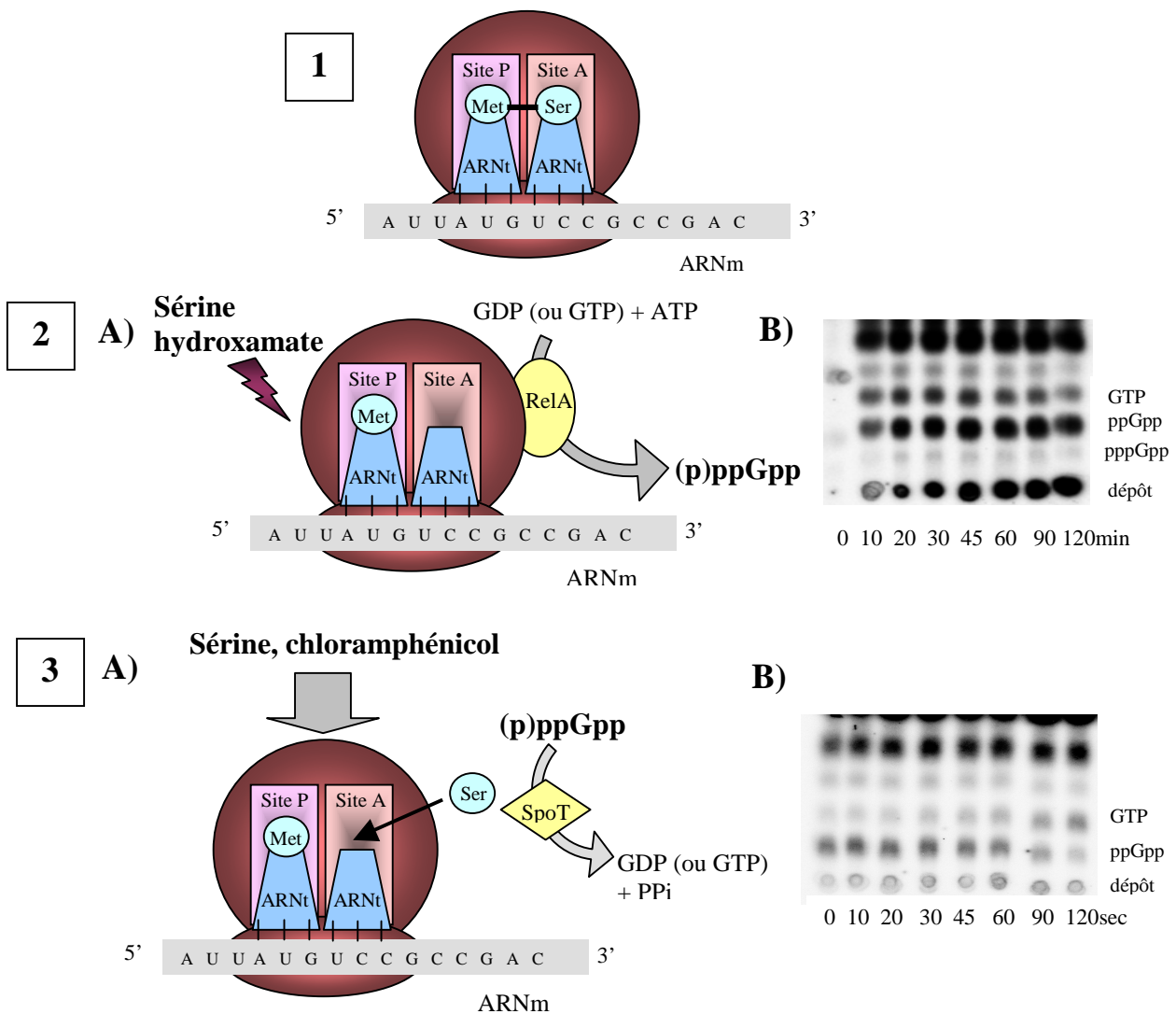
Les souches *relA*<sup>+</sup> sont toutes résistantes à des niveaux élevés d'aminotriazole (20mM) : les mutations *spoT* ne provoquent donc pas de diminution drastique du niveau de (p)ppGpp, par exemple en augmentant l'activité de dégradation de (p)ppGpp de SpoT (Tableau 5). Toutes les souches portant une délétion de *relA*, possédant ou non les allèles évolués de *spoT*, sont sensibles à l'aminotriazole même aux doses les plus faibles (Tableau 5). Les allèles évolués de *spoT* n'entraînent donc pas d'accumulation brutale de (p)ppGpp, suffisante pour conférer une résistance à l'aminotriazole. En présence de cette molécule, les



**Figure 35 : Effets des mutations *spoT* sur le métabolisme de (p)ppGpp : tests de résistance à l'accumulation de (p)ppGpp. A) Plasmides utilisés pour surexprimer RelA et ainsi augmenter la quantité intracellulaire de (p)ppGpp (Svitil *et al.*, 1993). Le plasmide pALS10 comporte le gène *relA* entier cloné en aval du promoteur *Ptac*, inductible par ajout d'IPTG. Le plasmide pALS13 permet de surexprimer la partie N-terminale de RelA (RelA'), qui possède une activité de synthèse de (p)ppGpp constitutive, indépendante de la liaison de RelA aux ribosomes. Ce plasmide permet de synthétiser plus de (p)ppGpp que le plasmide pALS10. Le plasmide pALS14, utilisé comme contrôle, comporte la partie N-terminale de RelA tronquée et produit une protéine inactive. B) Effet de l'induction de RelA et RelA' sur la croissance des souches portant les allèles *spoT<sup>anc</sup>* et *spoT<sup>évol</sup>*. Des cultures de nuit de chaque souche porteuse des plasmides pALS10, 13 et 14 en DM250 glucose contenant de l'ampicilline ont été striées sur boîtes de Pétri LB-agar Amp. Les stries ont été réalisées perpendiculairement à des dépôts de 10µL d'IPTG 50mM au centre des boîtes, de façon à induire l'expression des protéines sur la deuxième moitié de la boîte de Pétri. Les stries ont été réalisées de droite à gauche. Le plasmide contrôle pALS14 n'induit aucun retard de croissance, contrairement aux plasmides pALS10 et pALS13. Le niveau d'inhibition de croissance dû à une accumulation de (p)ppGpp est similaire dans les 4 souches.**

souches portant les allèles évolués de *spoT* se comportent donc de la même façon que la souche ancêtre, à la fois dans un contexte *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta relA$  (Tableau 5). Les étalements sur milieu minimum glucose avec ou sans casaminoacides ont également révélé l'absence de différence entre les souches portant les allèles ancestral et évolués de *spoT*, confirmant les résultats obtenus sur milieu contenant de l'aminotriazole (Tableau 5). Les mutations *spoT* pourraient donc ne pas affecter le métabolisme de (p)ppGpp. Cependant, la sensibilité de ces tests n'est pas suffisante pour détecter une modification faible du niveau de (p)ppGpp.

Nous avons réalisé un troisième test phénotypique basé sur le fait qu'un niveau trop élevé de (p)ppGpp est toxique pour les cellules et inhibe toute croissance (Cashel *et al.*, 1996). Afin de déceler un éventuel effet des mutations *spoT* sur l'activité de dégradation de (p)ppGpp par SpoT, nous avons artificiellement augmenté la quantité de (p)ppGpp dans les différentes souches et analysé l'effet de cet accroissement sur la croissance des cellules. Plusieurs vecteurs, fournis par Michael Cashel, ont été utilisés pour cette analyse. Différentes parties du gène *relA* ont été clonées dans le plasmide pBR322 sous contrôle du promoteur *Ptac* inductible par ajout d'IPTG (Svitil *et al.*, 1993) (Fig.35A). Le plasmide pALS10 permet la surexpression de la protéine RelA entière en présence d'IPTG, ce qui provoque une accumulation toxique de (p)ppGpp. Le plasmide pALS13 comporte les 455 codons de la partie 5' du gène *relA*. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture permet l'accumulation de la partie N-terminale de RelA (RelA'), qui possède une activité constitutive de synthèse de (p)ppGpp, ce qui provoque une accumulation de (p)ppGpp plus importante que pALS10. Enfin, le plasmide pALS14, utilisé comme contrôle, ne comporte que 331 codons de la partie 5' de *relA*, et entraîne la synthèse d'une protéine RelA tronquée et inactive (Svitil *et al.*, 1993) (Fig.35A). Les 3 plasmides ont été introduits dans les souches 606, A, NAP1 et NAP9. Les différentes souches obtenues ont été striées sur milieu solide LB-agar contenant de l'ampicilline sur lequel ont été préalablement déposées des gouttes de 10µL d'IPTG 50mM. Les stries passent à travers ces gouttes, de façon à induire l'expression des différentes protéines RelA sur la deuxième moitié des stries (Fig.35B). Ceci permet de comparer très facilement la croissance des souches portant les différents plasmides, avant et après induction. Les souches portant le plasmide contrôle pALS14 se développent normalement après induction à l'IPTG (Fig.35B). La présence du vecteur et de l'IPTG n'influence donc pas la croissance cellulaire. Les souches portant le plasmide pALS13 présentent une sensibilité importante à la présence d'IPTG dans le milieu de culture (Fig.35B). Cela suggère que dans tous les contextes génétiques étudiés, la surexpression de la protéine tronquée RelA' entraîne



**Figure 36 : Mesures des taux de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp par création d'une carence artificielle en sérine au moyen de sérine hydroxamate (inhibiteur de la séryl-tRNA synthétase). 1) Traduction en absence de sérine hydroxamate :** les ARNt chargés en sérine se fixent sur leur site, la synthèse protéique se déroule normalement. **2) Etude du taux de synthèse de (p)ppGpp par création d'une carence en sérine.** A) Traduction en présence de sérine hydroxamate : les ARNt ne sont pas chargés en sérine, ce qui inhibe la synthèse protéique. La protéine RelA détecte la pause des ribosomes et synthétise du (p)ppGpp. B) Mesure du taux de synthèse de (p)ppGpp par chromatographie sur couche mince : marquage métabolique des cellules au  $^{32}\text{P}$ , prélèvements à différents temps après ajout de sérine hydroxamate, extraction des nucléotides à l'acide formique 13M et séparation des nucléotides par migration sur CCM (Chromatographie sur Couche Mince). On peut constater la synthèse rapide de (p)ppGpp. **3) Etude du taux de dégradation de (p)ppGpp par création d'une carence en sérine et réversion de celle-ci par ajout de sérine et de chloramphénicol.** A) Mécanisme de réversion de la carence : l'ajout d'un excès de sérine et d'une petite quantité de chloramphénicol permet de charger à nouveau les ARNt en sérine. (p)ppGpp n'est donc plus synthétisé mais dégradé par la protéine SpoT. B) Mesure du taux de dégradation de (p)ppGpp. Marquage métabolique des cellules au  $^{32}\text{P}$ , ajout de sérine hydroxamate pendant quelques minutes puis ajout de sérine et chloramphénicol, extraction des nucléotides à l'acide formique et séparation par migration sur CCM. On peut constater la dégradation très rapide de (p)ppGpp.

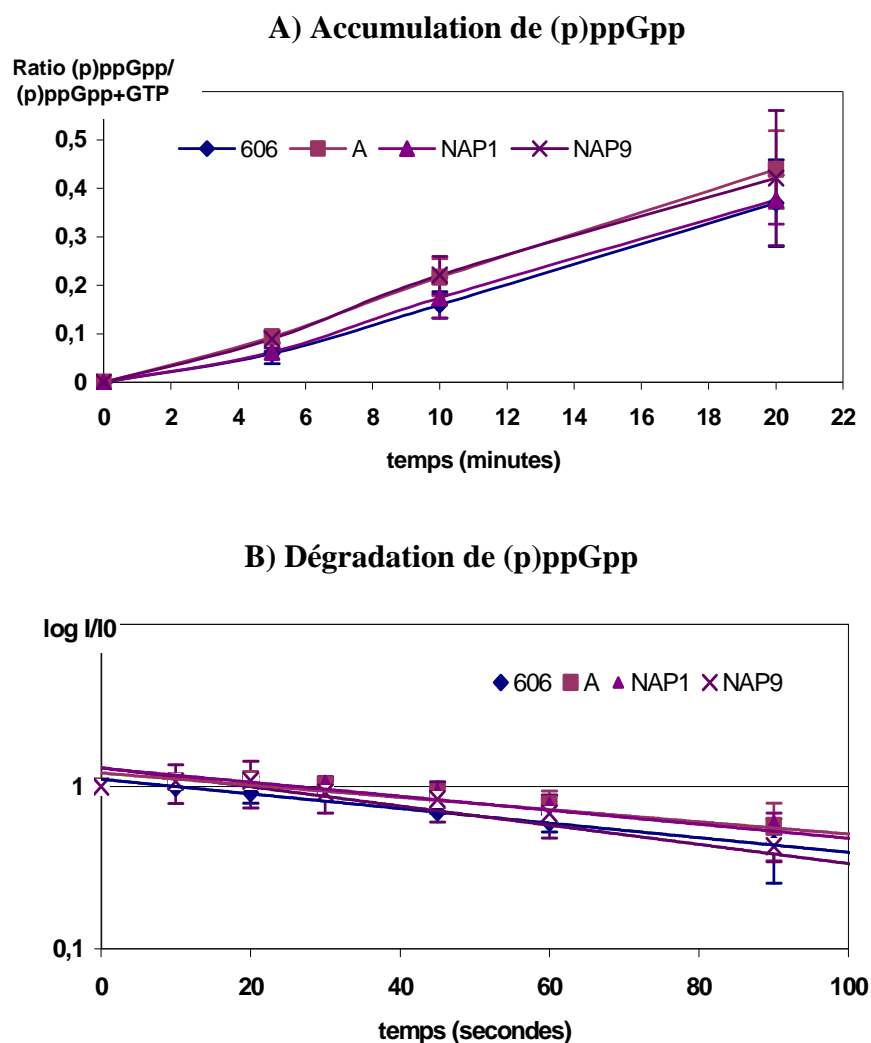
Des écrans de phosphore sont utilisés pour révéler les CCM, grâce à un scanner phosphoimager (Fujifilm). L'intensité des différents spots observés sur les CCM est quantifiée grâce au logiciel Image Gauge (Fujifilm). Les méthodes de calcul des vitesses de synthèse et dégradation de (p)ppGpp sont expliquées dans le texte.

une accumulation toxique de (p)ppGpp. C'est également le cas lorsque la protéine RelA entière est surexprimée (pALS10). Tous ces résultats ont été confirmés par le suivi de la croissance des mêmes souches contenant les différents plasmides en milieu liquide MOPS glucose avec ajout d'IPTG (2mM) en milieu de phase de croissance exponentielle (DO 600nm = 0,2) (résultats non montrés). Les souches 606, A, NAP1 et NAP9 portant le plasmide pALS10 présentent la même vitesse de croissance et celle-ci est stoppée dans tous les cas dès l'ajout d'IPTG. Les protéines SpoT mutantes ne possèdent donc *a priori* pas d'activité de dégradation de (p)ppGpp plus importante que la protéine ancestrale. A nouveau, il se pourrait que la sensibilité de ces tests de croissance ne soit pas suffisante pour détecter des différences faibles. Nous avons donc mesuré et comparé directement les niveaux de (p)ppGpp dans les différentes souches portant les allèles ancestral et évolués de *spoT* de 3 façons différentes : mesures des taux de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp, mesures du niveau absolu de (p)ppGpp au cours de la croissance.

#### II.3.1.2. Activités de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp

Afin d'étudier l'accumulation de (p)ppGpp, les souches 606, A, NAP1 et NAP9 ont d'abord été mises en culture dans du milieu MOPS glucose contenant de la sérine hydroxamate, qui crée une carence artificielle en ARNt chargés en sérine et déclenche l'accumulation de (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996). Le niveau de (p)ppGpp a été suivi par marquage métabolique des cellules au <sup>32</sup>P, prélèvements d'échantillons à intervalles de temps réguliers, extraction des nucléotides à l'acide formique 13M et migration des extraits sur chromatographie sur couche mince dans un tampon phosphate (voir section II.1.2.8) (Fig.36-1 et -2). Les chromatographies ont été exposées sur des écrans phosphore et révélées grâce à un scanner phosphoimager (Fujifilm). L'intensité des spots de (p)ppGpp a été quantifiée grâce au logiciel Image Gauge (Fujifilm). Afin de normaliser les résultats, à chaque dépôt, la quantité de (p)ppGpp a été rapportée à la somme des quantités de (p)ppGpp et GTP. Dans les souches que nous étudions, la quantité de pppGpp est négligeable.

Afin d'évaluer la vitesse de dégradation de (p)ppGpp, une carence artificielle a également été créée grâce à la sérine hydroxamate, ce qui déclenche l'accumulation de (p)ppGpp (Fig.36-1 et -2). Cette carence a ensuite été « réversée » par ajout d'un excès de sérine et d'une faible quantité de chloramphénicol (Fig.36-3). Cet antibiotique inhibe la traduction, ce qui rétablit le ratio ARNt chargés / ARNt non chargés et stoppe la synthèse de (p)ppGpp par RelA. La carence étant éliminée, (p)ppGpp est dégradé par SpoT. Ces tests ont



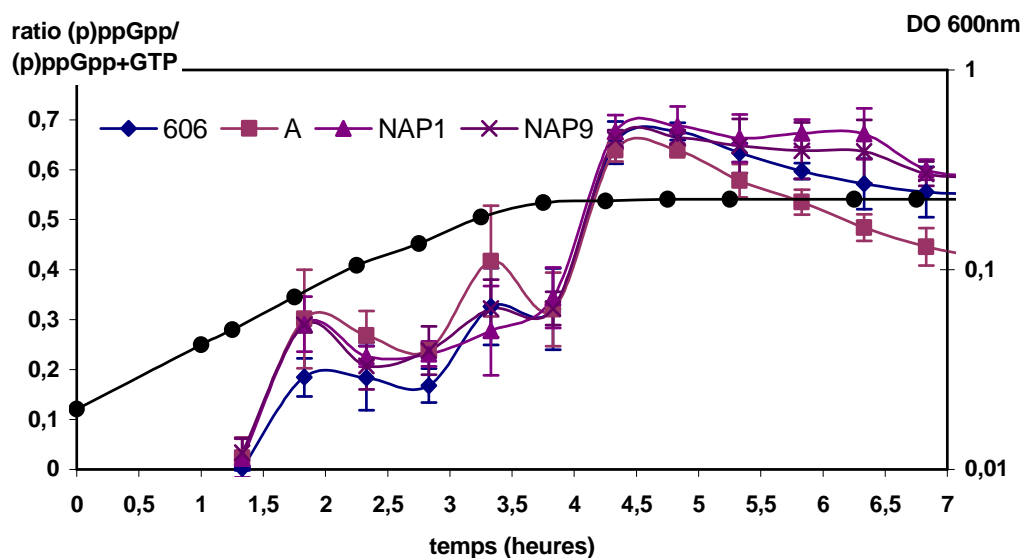
**Figure 37 : Effets des mutations *spoT* sur le métabolisme de (p)ppGpp. A) Mesure de la vitesse d'accumulation de (p)ppGpp dans les souches portant les allèles ancestral et évolués de *spoT*.** La synthèse de (p)ppGpp est déclenchée par ajout dans le milieu de culture de sérine hydroxamate, mimant une carence en sérine. (p)ppGpp est détecté comme expliqué dans la figure précédente. L'accumulation de (p)ppGpp est évaluée en calculant à chaque prélèvement le ratio (p)ppGpp/(p)ppGpp+GTP. Cette expérience tient compte à la fois de la synthèse de (p)ppGpp par RelA et SpoT et de la dégradation de (p)ppGpp par SpoT. **B) Mesure de la vitesse de dégradation de (p)ppGpp par réversion de la carence artificielle en sérine** et prélèvement d'échantillons toutes les 10 secondes. Ceux-ci sont également analysés par CCM. La vitesse de dégradation de (p)ppGpp est évaluée en calculant le logarithme du rapport de l'intensité des spots de (p)ppGpp obtenus à chaque prélèvement (I) sur l'intensité des spots obtenus au moment de la réversion de carence (I0). Ce graphique présente les courbes de tendance exponentielles associées à chaque série de valeurs. La dégradation de (p)ppGpp ne fait intervenir que la protéine SpoT. La dégradation de (p)ppGpp n'est pas instantanée, mais présente un temps de latence de 20 à 25 secondes.

également été réalisés en présence de  $^{32}\text{P}$  qui est incorporé dans les nucléotides et les sucres phosphate synthétisés pendant l'expérience, ce qui permet de suivre l'évolution de (p)ppGpp (Fig.36-3). Des échantillons ont été prélevés toutes les 10sec après réversion de la carence, et ce pendant 2 minutes, puis traités de la même façon que précédemment. La trajectoire de dégradation de (p)ppGpp a été tracée en calculant le rapport de la quantité de (p)ppGpp dosée à chaque prélèvement (I) sur la quantité de (p)ppGpp dosée au moment de la réversion de la carence ( $I_0$ ). La vitesse de dégradation de (p)ppGpp étant exponentielle, ce rapport a été converti en logarithme.

L'accumulation de (p)ppGpp a été mesurée dans les souches 606, A, NAP1 et NAP9 après ajout de sérine hydroxamate, à partir de trois cultures indépendantes de chaque souche (Fig.37A). En réalité, ces mesures tiennent compte d'un équilibre entre la synthèse de (p)ppGpp par RelA et la dégradation de (p)ppGpp par SpoT. En effet, lors d'une telle carence, la protéine SpoT synthétise un niveau très faible de (p)ppGpp contrairement à RelA. Les différentes souches présentent une vitesse d'accumulation de (p)ppGpp équivalente de l'ordre de 0,02/min. Les mutations *spoT* n'influencent donc pas l'accumulation de (p)ppGpp lors de carences en acides aminés. La vitesse de dégradation de (p)ppGpp a été mesurée dans les mêmes souches (Fig.37B). La dégradation de (p)ppGpp n'implique que la protéine SpoT. Il existe un temps de latence de 20 à 25 secondes après ajout de sérine et de chloramphénicol avant que le niveau de (p)ppGpp ne commence à diminuer. Les protéines SpoT évoluées sont fonctionnelles et ne semblent pas présenter une vitesse de dégradation de (p)ppGpp significativement différente de la protéine ancestrale (Fig.37). La demi-vie de (p)ppGpp est environ égale à 70 secondes. Les mutations ne modifient donc pas le métabolisme de (p)ppGpp de façon détectable, ce qui confirme les tests de croissance réalisés précédemment.

#### II.3.1.3. Métabolisme de (p)ppGpp au cours de la croissance

Afin d'étudier les effets des mutations sur le niveau de (p)ppGpp au cours de la croissance bactérienne, les souches 606, A, NAP1 et NAP9 ont été cultivées en milieu MOPS contenant du glucose comme seule source de carbone. Il est impossible de tester ce phénotype dans le milieu de l'évolution expérimentale DM25 glucose. En effet, celui-ci contient une concentration trop importante de phosphate, ce qui rend l'incorporation de phosphate radioactif dans les nucléotides impossible à quantifier précisément. En phase de croissance exponentielle ( $\text{DO} \approx 0,02$ ),  $10\mu\text{Ci/mL}$  de  $^{32}\text{P}$  ont été ajoutés aux cultures et des prélèvements ont été effectués à intervalles de temps réguliers afin de suivre l'évolution de DO et de



**Figure 38 : Effets des mutations *spoT* sur le métabolisme de (p)ppGpp. Evolution du niveau de (p)ppGpp dans les souches portant les allèles *spoT*<sup>anc</sup> et *spoT*<sup>évol</sup> au cours de la croissance bactérienne dans le milieu minimum MOPS glucose.** La courbe de croissance (en noir) représente la croissance représentative des 4 souches mesurée par DO à 600nm. Les souches sont cultivées jusqu'à une DO600 égale à environ 0,02, puis du <sup>32</sup>P est ajouté dans chaque culture à raison de 10μCi/mL. Des prélèvements sont effectués toutes les demi-heures et analysés par CCM. Les calculs de quantité de (p)ppGpp sont effectués de la même façon que lors des expériences d'accumulation de (p)ppGpp. Après ajout de <sup>32</sup>P, la quantité de (p)ppGpp augmente rapidement pour se stabiliser ensuite pendant toute la phase exponentielle. Lors du passage en phase stationnaire, la quantité de (p)ppGpp augmente très rapidement et de façon similaire dans les 4 souches.



concentration de (p)ppGpp. Les échantillons et les données ont été traités de la même façon que lors des expériences de synthèse de (p)ppGpp. L'entrée des cellules en phase stationnaire est due à l'épuisement du glucose, ce type de carence entraînant la synthèse de (p)ppGpp majoritairement par SpoT (Xiao *et al.*, 1991).

Le niveau de (p)ppGpp varie de la même façon, que les souches portent les allèles *spoT* ancestral ou évolués (Fig.38). Immédiatement après ajout de  $^{32}\text{P}$ , le niveau de (p)ppGpp augmente brutalement, reflétant la vitesse d'accumulation de (p)ppGpp en phase exponentielle. Le niveau de (p)ppGpp se stabilise ensuite, reflétant le niveau basal de (p)ppGpp au cours de la phase de croissance exponentielle. Ce niveau basal ne varie pas de façon significative dans les différentes souches. Lors de l'entrée en phase stationnaire, le niveau de (p)ppGpp augmente brutalement et simultanément dans les 4 souches, selon le même profil. Les mutations *spoT* ne semblent donc pas influencer le métabolisme de (p)ppGpp face à une carence en glucose dans le milieu MOPS. L'effet bénéfique des mutations *spoT* mesuré dans le milieu MOPS glucose (section II.2.5) n'est donc probablement pas dû à un changement du niveau de (p)ppGpp. Le fait que les allèles évolués de *spoT* confèrent une augmentation de fitness similaire dans le milieu MOPS glucose et le milieu DM25 glucose (environ 10%) suggère également que les mutations n'ont probablement pas d'effet sur le niveau de (p)ppGpp au cours de l'évolution en DM25 glucose. Afin de confirmer que le bénéfice est apporté par un mécanisme indépendant du niveau de (p)ppGpp, nous avons étudié l'effet des mutations *spoT* sur le fitness dans un contexte génétique quasiment dépourvu de (p)ppGpp, c'est-à-dire dans des souches délétées du gène *relA*.

### II.3.2. Bénéfice apporté par les mutations *spoT* en quasi-absence de (p)ppGpp

Une délétion en phase du gène *relA* a été introduite au moyen du plasmide suicide pKO3 dans la souche *spoT*<sup>anc</sup> 606, donnant la souche DVS17. Les allèles évolués de *spoT* des populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 ont ensuite été introduits dans la souche DVS17, toujours au moyen du plasmide suicide pKO3, donnant respectivement les souches NAP17, NAP18 et NAP22. Les 4 souches ancestrales  $\Delta relA$  portant les allèles ancestral et évolués de *spoT* (DVS17, NAP17, NAP18, NAP22) ont été utilisées dans des expériences de compétition contre l'ancêtre Ara+ *relA*<sup>+</sup> 607. La comparaison du fitness des 4 souches a ainsi permis d'estimer l'impact des allèles évolués de *spoT* dans un contexte génétique délété de *relA*. La délétion du gène *relA* ne semble pas avoir d'effet sur le fitness (Tableau 6) (606  $\Delta relA$  :  $f=0,9903$ ,  $H_0=1$ ,  $n=3$ ,  $ts=0,413$ ,  $p=0,7199$ ). Or, *a priori* le faible niveau de (p)ppGpp observé

<b>Fitness relatif par rapport à 607</b>	<b>Contexte <i>relA</i><sup>+</sup></b>	<b>Contexte <i>ΔrelA</i><sup>-</sup></b>
<b>606 (<i>spoT</i><sup>anc</sup>)</b>	<b>f=1,0058</b> <i>p</i> =0,146	<b>f=0,9903</b> <i>p</i> =0,7199
<b>A (606 <i>spoT</i><sup>-1</sup>)</b>	<b>f=1,0935</b> <i>p</i> =0,0001	<b>f=1,1565</b> <i>p</i> =0,0047
<b>NAP1 (606 <i>spoT</i><sup>+2</sup>)</b>	<b>f=1,1195</b> <i>p</i> =0,0001	<b>f=1,1097</b> <i>p</i> =2,53.10 <sup>-5</sup>
<b>NAP9 (606 <i>spoT</i><sup>-4</sup>)</b>	<b>f=1,1196</b> <i>p</i> =0,0001	<b>f=1,0396</b> <i>p</i> =0,047

**Tableau 6 : Fitness relatif de l'ancêtre 606 *relA*<sup>+</sup> ou *ΔrelA* portant les allèles ancestral ou évolués de *spoT* par rapport à l'ancêtre 607, mesuré en DM25 glucose au bout de 24h de compétition.** Les mutations *spoT* apparues dans les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 apportent un bénéfice à la fois dans un contexte *relA*<sup>+</sup> et *ΔrelA*. f : valeur de fitness, *p* : valeur de probabilité (Test statistique de Student, intervalle de confiance = 95%, hypothèse nulle = 1).

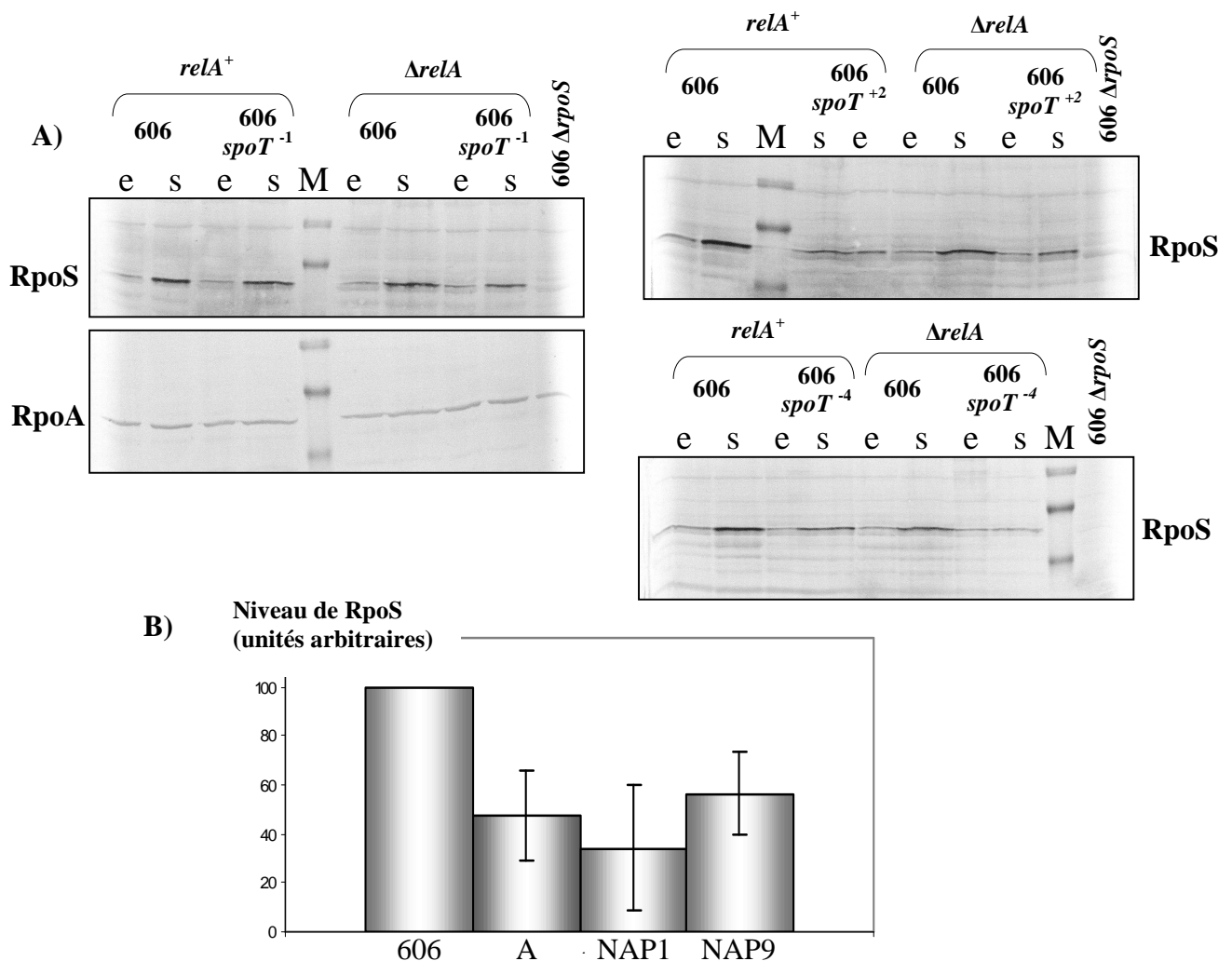
dans ce contexte génétique devrait avoir un effet négatif sur la résistance des bactéries aux carences nutritionnelles, notamment en phase stationnaire. Le fait que la délétion de *relA* soit neutre dans ces conditions pourrait refléter le temps relativement faible passé en phase stationnaire au cours de cette expérience (environ 17h). Les résultats montrent que les trois allèles évolués de *spoT* confèrent un bénéfice important dans le contexte  $\Delta relA$  (Tableau 6) (606  $\Delta relA spoT^{-1}$ :  $f=1,1565$ ,  $H_0=1$ ,  $n=7$ ,  $ts=4,38$ ,  $p=0,0047$ , 606  $\Delta relA spoT^{+2}$ :  $f=1,1097$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=14,82$ ,  $p=2,53.10^{-5}$ , 606  $\Delta relA spoT^{-4}$ :  $f=1,0396$ ,  $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=2,62$ ,  $p=0,047$ ). L'avantage apporté par les mutations *spoT* est donc lié à un mécanisme moléculaire qui n'est pas lié aux fluctuations de la quantité de (p)ppGpp, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment. La mutation de la population Ara-4 semble cependant conférer un avantage moins important que les deux autres mutations dans un contexte  $\Delta relA$ . Dans ce cas, une partie du bénéfice est donc dépendante de la présence de RelA.

Afin de déterminer si les mutations *spoT* affectent tout de même la réponse stringente mais indépendamment de (p)ppGpp, nous avons évalué leur impact sur l'expression de gènes cibles appartenant au régulon de la réponse stringente : *rpoS*, régulé positivement et les opérons d'ARN stables, régulés négativement par (p)ppGpp.

### **II.3.3. Effets des mutations *spoT* sur l'expression d'un gène cible régulé positivement par (p)ppGpp : *rpoS***

Lors de carences nutritionnelles, l'accumulation de (p)ppGpp active l'expression de RpoS, le facteur sigma spécifique de la phase stationnaire et de nombreuses conditions de stress (Gentry *et al.*, 1993). L'expression de *rpoS* semble activée par (p)ppGpp aussi bien au niveau transcriptionnel que traductionnel, bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu ne soient pas clairement déterminés (Brown *et al.*, 2002). Cependant, l'effet positif de (p)ppGpp sur l'expression de  $\sigma^S$  est toujours observé lorsque la séquence codante de *rpoS* est placée en aval d'un autre promoteur (*Ptac* ou *PlacUV5*) (Brown *et al.*, 2002). En effet, (p)ppGpp stimule la traduction de  $\sigma^S$  d'une manière dépendante de la présence de *dkcA*, par un mécanisme indéterminé (Brown *et al.*, 2002). Afin de déterminer si les mutations *spoT* entraînent une modification de l'expression de *rpoS*, celle-ci a été étudiée aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel dans les souches 606, A, NAP1 et NAP9.

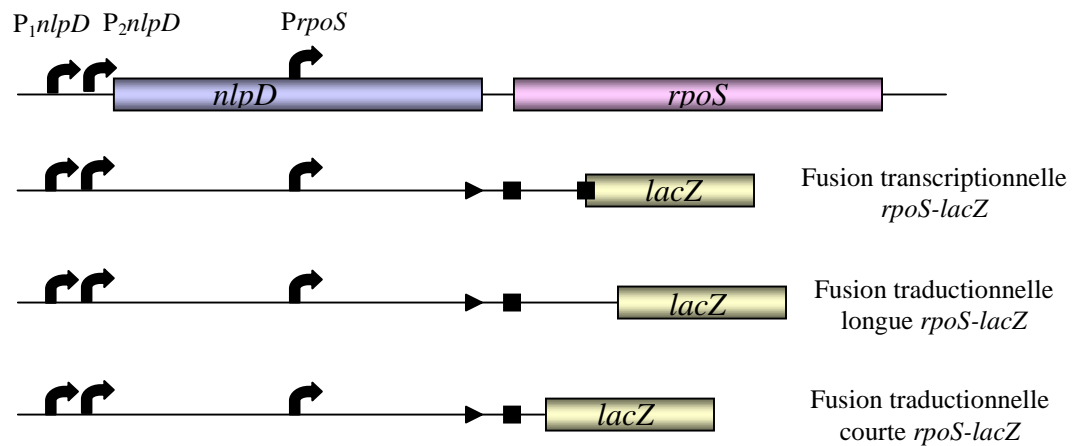
Dans un premier temps, l'expression de RpoS dans les souches *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta relA$  portant les allèles ancestral et évolués de *spoT* a été étudiée par Western-blot. Les différentes



**Figure 39 : Effets des mutations *spoT* sur l'expression de RpoS. A) Etude de l'expression de RpoS dans les souches porteuses des allèles *spoT*<sup>anc</sup> et *spoT*<sup>évol</sup> dans un contexte génétique *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta$ *relA*. Des Western-blots ont été réalisés avec un anticorps dirigé contre RpoS sur des extraits cellulaires bruts des souches d'intérêt, cultivées en milieu DM250 glucose à 37°C. Des échantillons ont été prélevés en phase exponentielle (DO600  $\approx$  0,15) et en phase stationnaire (8h, DO600  $\approx$  0,3 à 0,35 selon les souches), excepté pour la souche contrôle 606 $\Delta$ *rpoS*, dont un seul échantillon a été prélevé en phase stationnaire. Les extraits bruts ont été préparés selon le protocole détaillé dans la section Matériel et Méthodes. Vingt microgrammes de chaque extrait protéique ont été déposés dans chaque puits. **M** : marqueur de poids moléculaire, **e** : échantillon prélevé en phase exponentielle, **s** : échantillon prélevé en phase stationnaire. Des Western-blots ont également été réalisés sur les mêmes échantillons avec un anticorps contrôle dirigé contre la sous-unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase RpoA, dont la concentration cellulaire est *a priori* constante (un seul Western-blot contrôle est présenté sur cette figure). Dans un contexte  $\Delta$ *relA*, le niveau de RpoS est plus faible que dans un contexte *relA*<sup>+</sup>, ceci est dû à la baisse du niveau de (p)ppGpp, activateur de l'expression de RpoS. Les 3 mutations *spoT* étudiées provoquent une baisse du niveau de RpoS dans tous les contextes. **B) Quantification de la protéine RpoS en phase stationnaire dans les souches porteuses des mutations *spoT* par rapport à la souche ancêtre 606.** Deux Westerns-blots réalisés à partir de 2 cultures indépendantes ont été utilisés pour ce calcul. L'intensité de la bande correspondant à RpoS a été rapportée à celle de la bande correspondant à la protéine contrôle RpoA, ou à une bande non spécifique apparaissant dans les Western-blot dirigés contre RpoS et dont l'intensité ne varie pas selon les souches. Cette analyse a été effectuée grâce au logiciel d'analyse d'image Image Gauge (Fujifilm). La quantité de RpoS mesurée dans 606 est fixée arbitrairement à 100.**

souches ont été cultivées en milieu DM250 glucose et des prélèvements ont été effectués en phase de croissance exponentielle (DO 600nm  $\approx$  0,15), ainsi qu'en phase stationnaire après 8h d'incubation. Des Western-blots ont été effectués à partir de 20µg d'extraits bruts issus de chaque échantillon en utilisant un anticorps dirigé contre RpoS et un anticorps contrôle dirigé contre RpoA, dont le niveau ne semble pas varier au cours de la croissance (Fig.39A). Les mutations *spoT* n'influent pas sur la cinétique d'induction de RpoS lors de la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire. En effet, pour toutes les souches, la quantité de RpoS est faible en phase exponentielle et est ensuite fortement induite lors de la transition vers la phase stationnaire. En revanche, le niveau d'induction de RpoS atteint en phase stationnaire semble légèrement diminué dans les souches portant les allèles évolués de *spoT* par rapport aux souches portant l'allèle ancestral, et ce quel que soit le contexte génétique *relA*<sup>+</sup> ou  $\Delta$ *relA* (Fig.39A). Les souches  $\Delta$ *relA* semblent présenter un niveau de RpoS plus faible que les souches *relA*<sup>+</sup>, ceci étant probablement dû à la faible concentration intracellulaire de (p)ppGpp. Le niveau de RpoS en phase stationnaire a été quantifié dans les souches 606, A, NAP1 et NAP9 par mesure de l'intensité de la bande correspondante sur deux Western-blots, réalisés à partir d'échantillons indépendants grâce au logiciel Image Gauge (Fujifilm). Cette intensité a été rapportée à celle de la protéine contrôle RpoA ou d'une protéine mise en évidence de façon non spécifique par l'anticorps anti-RpoS et dont l'intensité ne varie pas selon le contexte génétique, ni la phase de croissance. Cette quantification révèle une diminution de 30 à 50% du niveau de RpoS dans les souches portant les allèles évolués de *spoT* par rapport à la souche portant l'allèle ancestral (Fig.39B). Selon les résultats obtenus précédemment, ce phénotype ne serait pas dû à une diminution du niveau de (p)ppGpp dans les souches *spoT*<sup>evol</sup>. La protéine SpoT jouerait donc un rôle dans l'expression de RpoS, régulée de façon complexe aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (pour revue, Hengge-Aronis, 2002b), par un mécanisme inconnu et indépendant de (p)ppGpp.

Cette diminution étant relativement faible, nous avons voulu confirmer cela de façon indépendante, grâce à l'utilisation de fusions transcriptionnelles et traductionnelles *PrpoS-lacZ*, fournies par Regine Hengge (Fig.40). La fusion transcriptionnelle comporte les 3 promoteurs connus pour contrôler *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002b), en amont du gène *lacZ*. Les deux promoteurs *PnlpD* permettent l'expression des gènes *nlpD* et *rpoS*, qui forment un opéron, et ne semblent pas régulés différenciellement en fonction de la croissance (Hengge-Aronis, 2002). Le gène *rpoS* est également sous contrôle de son propre promoteur, soumis à de nombreuses régulations (Hengge-Aronis, 2002b). Deux fusions traductionnelles sont



**Figure 40 : Fusions transcriptionnelles et traductionnelles *rpos-lacZ* utilisées dans cette étude (Lange et Hengge-Aronis, 1994).** Le schéma supérieur présente le gène *rpoS* sous le contrôle de trois promoteurs (flèches courbées). Les promoteurs *PnlpD* ne sont pas régulés, contrairement au promoteur spécifique de *rpoS* (Hengge-Aronis, 2002). Les fusions transcriptionnelles et traductionnelles *rpoS-lacZ* utilisées sont schématisées en dessous. La nature de chaque fusion (transcriptionnelle, traductionnelle) est indiquée à droite. Les pointes de flèches symbolisent le codon d'arrêt de la traduction de *nlpD*. Les carrés noirs représentent les sites de fixation des ribosomes de *rpoS* et *lacZ*. La fusion traductionnelle longue *rpoS-lacZ* comporte 247 codons en 5' de *rpoS* fusionnés à *lacZ*, tandis que la fusion courte en comporte uniquement 23. La partie du gène *rpoS* incluant les codons 23 à 247 contient une séquence importante pour le contrôle de la dégradation de RpoS. La fusion longue permet donc d'évaluer l'impact du contexte génétique dans lequel elle est introduite à la fois sur la transcription, la traduction et la protéolyse de RpoS.

utilisées dans ce travail. La fusion traductionnelle courte, dans laquelle le gène *lacZ* est cloné directement en aval du RBS de *rpoS*, résulte en l'expression d'une protéine de fusion comportant 23 acides aminés N-terminaux de RpoS et la  $\beta$ -galactosidase. Cette fusion permet d'évaluer à la fois la transcription et l'initiation de la traduction de *rpoS*. La fusion traductionnelle longue comporte 247 codons de la partie 5' du gène *rpoS*, importants pour le contrôle traductionnel et la protéolyse de RpoS (Lange et Hengge-Aronis, 1994 ; Becker *et al.*, 1999). Elle permet donc également d'évaluer la régulation de la dégradation de RpoS. Ces 3 types de fusions transcriptionnelles et traductionnelles ont donc été introduites au niveau du site d'attachement du bactériophage  $\lambda$  dans chacune des souches 606, A, NAP1 et NAP9, portant les allèles ancestral et évolués de *spoT*. Trois cultures indépendantes pour chacune des 12 souches obtenues ont été incubées pendant 8h à 37°C dans le milieu DM250 glucose et les activités spécifiques  $\beta$ -galactosidase ont été mesurées (Tableau 7). Les valeurs obtenues pour les différents mutants ont été comparées à celles de l'ancêtre, fixées arbitrairement à 100. Les 3 mutations *spoT* provoquent une diminution de 35 à 40% de l'expression de *rpoS*, et ce pour les 3 types de fusions, ce qui confirme les résultats obtenus par Western-blot. Ceci implique que les mutations *spoT* ont un effet négatif sur la transcription de *rpoS*. La mutation *spoT* de la population Ara-4 (souche NAP9) semble avoir un léger effet additionnel sur la traduction puisque l'expression des fusions traductionnelles est presque 70% plus faible que chez l'ancêtre (Tableau 7). L'effet des mutations *spoT* sur la transcription de *rpoS* a également été mesuré dans les milieux de culture DM250 glycérol et MOPS glucose, qui ont été utilisés précédemment (Tableau 7). Des résultats similaires ont été obtenus, les mutations *spoT* semblant inhiber légèrement la transcription de *rpoS*.

La stabilité de la protéine RpoS a également été évaluée dans les souches 606, A, NAP1 et NAP9, cultivées en milieu DM250 glucose durant 8 heures. Une forte concentration de chloramphénicol (200 $\mu$ g/mL) a été ajoutée aux cultures afin de bloquer toute synthèse protéique. Des prélèvements ont été effectués toutes les demi-heures pendant deux heures et la quantité de RpoS a été analysée par Western-blot. La stabilité de RpoS ne semble pas affectée dans les mutants par rapport à la souche ancêtre, ce qui confirme les résultats obtenus grâce aux fusions traductionnelles (résultats non montrés).

L'effet des mutations *spoT* sur la transcription de *rpoS* est significatif, mais relativement faible, ce qui pose la question de sa signification physiologique. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons étudié l'effet des mutations *spoT* sur la transcription de plusieurs gènes cibles de *rpoS* : *bolA* (Lange et Hengge-Aronis, 1991a), *csiD* (Marschall *et*

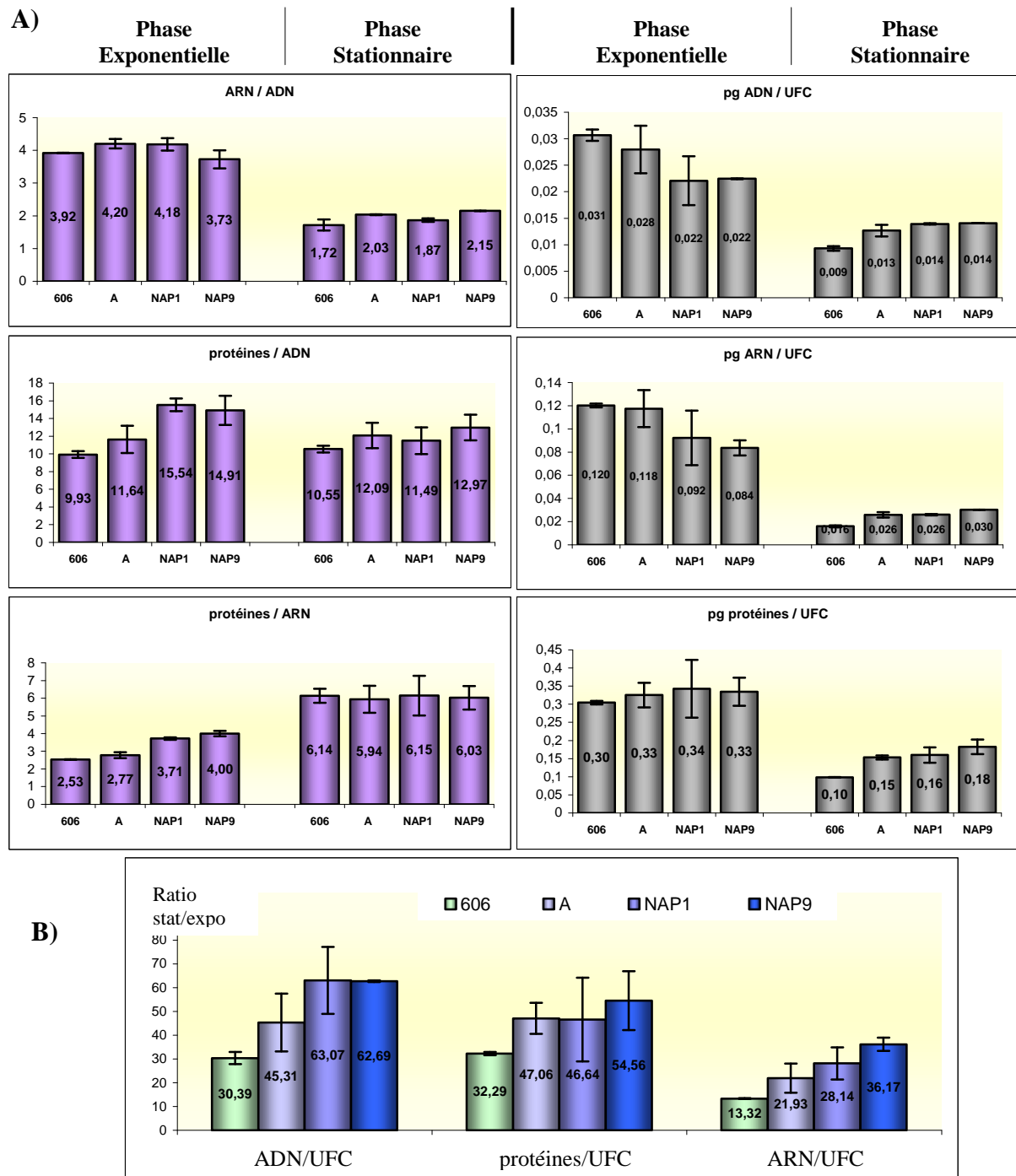
Milieu de culture	Type de fusion	606	A	NAP1	NAP9
<b>DM 250 glucose</b>	Fusion transcriptionnelle <i>PrpoS-lacZ</i>	100	58,51 +/- 2,31	63,14 +/- 4,94	65,83 +/- 14,5
	Fusion traductionnelle courte <i>PrpoS-lacZ</i>	100	72,66 +/- 8,6	43,61 +/- 2,23	33,98 +/- 9,12
	Fusion traductionnelle longue <i>PrpoS-lacZ</i>	100	64,00 +/- 3,72	58,69 +/- 2,34	25,8 +/- 1,49
<b>DM 250 glycérol</b>	Fusion transcriptionnelle <i>PrpoS-lacZ</i>	100	45,72 +/- 1,66	34,12 +/- 6,86	36,57
<b>MOPS glucose</b>	Fusion transcriptionnelle <i>PrpoS-lacZ</i>	100	63,23 +/- 2,46	58,84 +/- 0,07	54,98 +/- 3,94

**Tableau 7 : Effets des mutations *spoT* sur l'expression de *rpoS*.** Activités spécifiques  $\beta$ -galactosidase de fusions *PrpoS-lacZ* introduites au site d'attachement du bactériophage  $\lambda$  dans les contextes génétiques *spoT*<sup>anc</sup> et *spoT*<sup>évol</sup>, mesurées au bout de 24h dans différents milieux de culture. Les fusions *PrpoS-lacZ* utilisées sont détaillées dans la figure 40. Les activités  $\beta$ -galactosidase relatives des souches mutantes sont exprimées par rapport à l'ancêtre dont l'activité est toujours fixée arbitrairement à 100 (nmol de substrat utilisé / sec /  $\mu$ g de protéines). La déviation standard est calculée pour chaque expérience réalisée à partir de 3 cultures indépendantes.



*al.*, 1998), *osmE* (Conter *et al.*, 1997), *osmY* (Yim *et al.*, 1994) et *osmC* (Bouvier *et al.*, 1998). Le gène *bolA* est impliqué dans la modification de la morphologie bactérienne lors de la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire (voir introduction section II.1.2.3) (Santos *et al.*, 2002). Les gènes *osmE*, *osmY* et *osmC* sont impliqués dans la résistance au stress osmotique (Conter *et al.*, 1997 ; Gordia et Gutierrez, 1996 ; Yim *et al.*, 1994). Le gène *csiD* est induit lors de carences en sources de carbone (Marschall *et al.*, 1998). Les fusions *PosmE-lacZ*, *PosmY-lacZ* et *PosmC-lacZ*, insérées au niveau du locus *malA* et fournies par C. Gutierrez (Bordes *et al.*, 2003 ; Bouvier *et al.*, 1998), ont été introduites par transduction grâce au bactériophage P1 dans les souches 606, A, NAP1 et NAP9. Les fusions *PcsiD-lacZ* et *PbolA-lacZ*, fournies respectivement par R. Hengge et M. Vicente, ont été introduites dans les différents contextes génétiques au niveau du site d'attachement du bactériophage lambda. L'activité spécifique  $\beta$ -galactosidase des différentes souches a été mesurée en phase stationnaire, au bout de 24h de culture dans le milieu DM250 glucose. La transcription des gènes *osmE*, *osmC*, *osmY* et *csiD* n'est pas affectée par les mutations *spoT* (résultats non montrés), contrairement au gène *bolA*, dont l'expression est légèrement inférieure dans les souches portant les allèles évolués de *spoT* (activité spécifique  $\beta$ -galactosidase relative 606 : 100, A : 77,82 +/- 3,18, NAP1 : 71,62 +/- 2,82, NAP9 : 59,87 +/- 2,6). Les mutations de *spoT* entraînent donc une faible diminution de l'expression de *rpoS*, qui n'a quasiment pas de répercussion sur ses gènes cibles. Cette diminution n'est donc probablement pas physiologiquement significative, du moins dans ces conditions expérimentales.

Un des effets majeurs de la réponse stringente est la diminution de la concentration cellulaire en ADN, ARN et protéines lors de la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire. Ceci est dû notamment à la répression de la synthèse des ARN ribosomiques qui représentent plus de 90% des ARN totaux, une inhibition de la réplication de l'ADN et de la traduction globale, ainsi qu'une activation de la protéolyse. Nous avons analysé la composition intracellulaire des souches contenant les allèles ancestral et évolués de *spoT* lors des transitions croissance-carence.

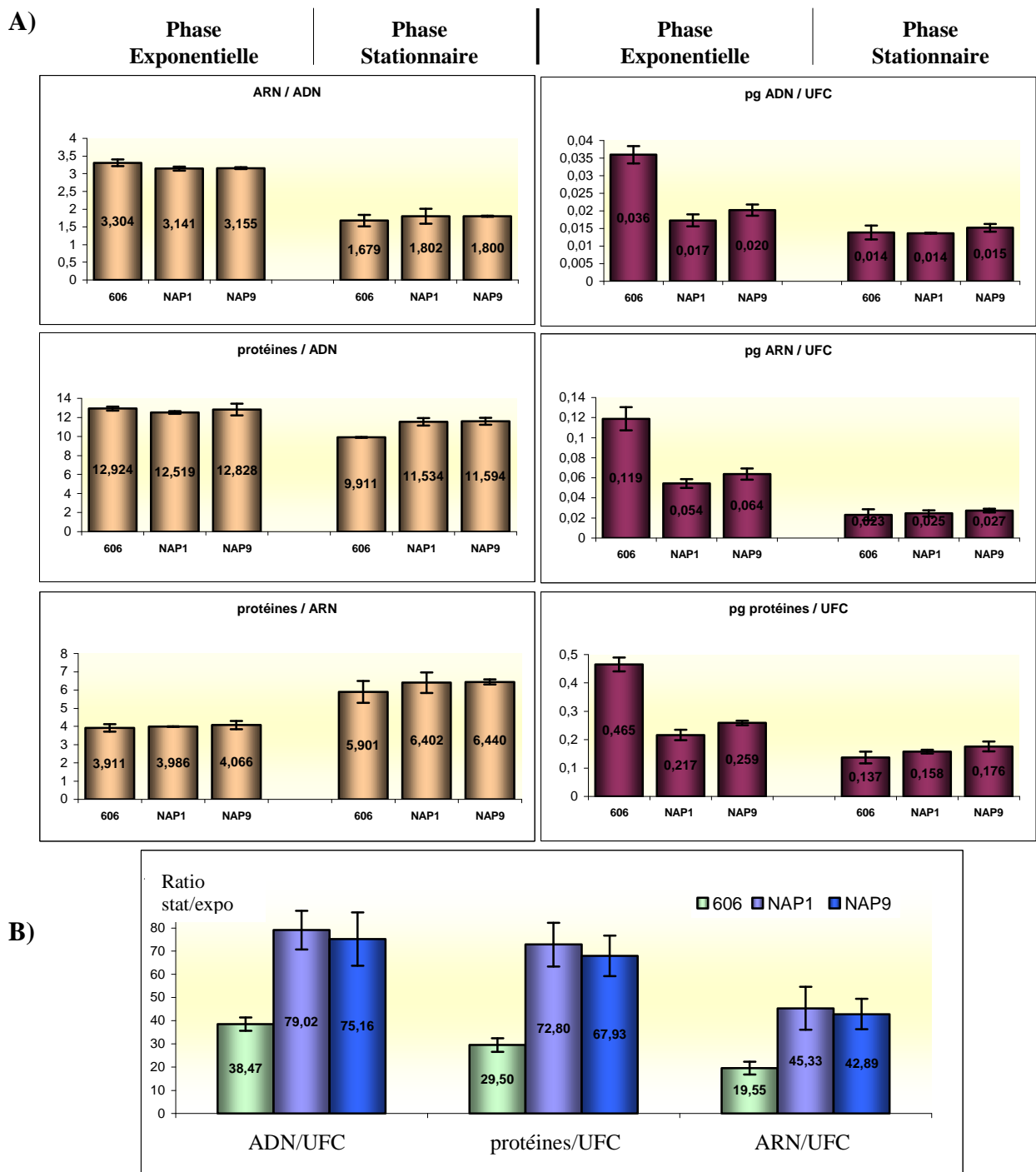


**Figure 41 : Effets des mutations *spoT* sur la composition en ADN, ARN et protéines des cellules cultivées en milieu DM250 glucose. A) Composition cellulaire en ADN, ARN et protéines des souches *spoT*<sup>anc</sup> et *spoT*<sup>évol</sup> selon les phases de croissance.** Les graphiques de droite représentent les concentrations en ADN, ARN et protéines exprimées en pg/UFC. Les graphiques de gauche indiquent les ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN de chaque souche. Pour tous les graphiques, les 4 histogrammes de gauche représentent les valeurs obtenues en phase de croissance exponentielle (DO600 ≈ 0,15), tandis que ceux de droite indiquent les valeurs obtenues en phase stationnaire au bout de 24h. **B) Pourcentage de macromolécules organiques en phase stationnaire (stat) par rapport à la phase de croissance exponentielle (expo).** Les étiquettes de données sont indiquées à l'intérieur des histogrammes.

#### II.3.4. Effets des mutations *spoT* sur la composition cellulaire en ADN, ARN et protéines

Trois cultures indépendantes des souches 606, A, NAP1 et NAP9 ont été effectuées en milieu DM250 glucose. Des échantillons ont été prélevés en phase de croissance exponentielle, à une densité optique à 600nm environ égale à 0,15, ainsi qu'en phase stationnaire après 24h d'incubation. La concentration cellulaire des échantillons a été déterminée par dilutions, étalements sur LB-agar et comptage des colonies. Les échantillons ont également été observés au microscope afin de s'assurer qu'aucune souche ne présente plus de chapelets de cellules que les autres, diminuant alors la concentration en UFC/mL. La concentration protéique des échantillons a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), tandis que les concentrations en ADN et ARN totaux ont été mesurées grâce aux kits de dosage Quant-it™ RNA et Quant-it™ DNA high sensitivity (Invitrogen), selon le protocole détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (II.1.2.6). Les ARN totaux étant représentés à plus de 90% par les ARN stables (Bremer et Dennis, 1996), nous estimons que les modifications de concentration d'ARN observées sont principalement dues à des changements de niveau des ARN stables.

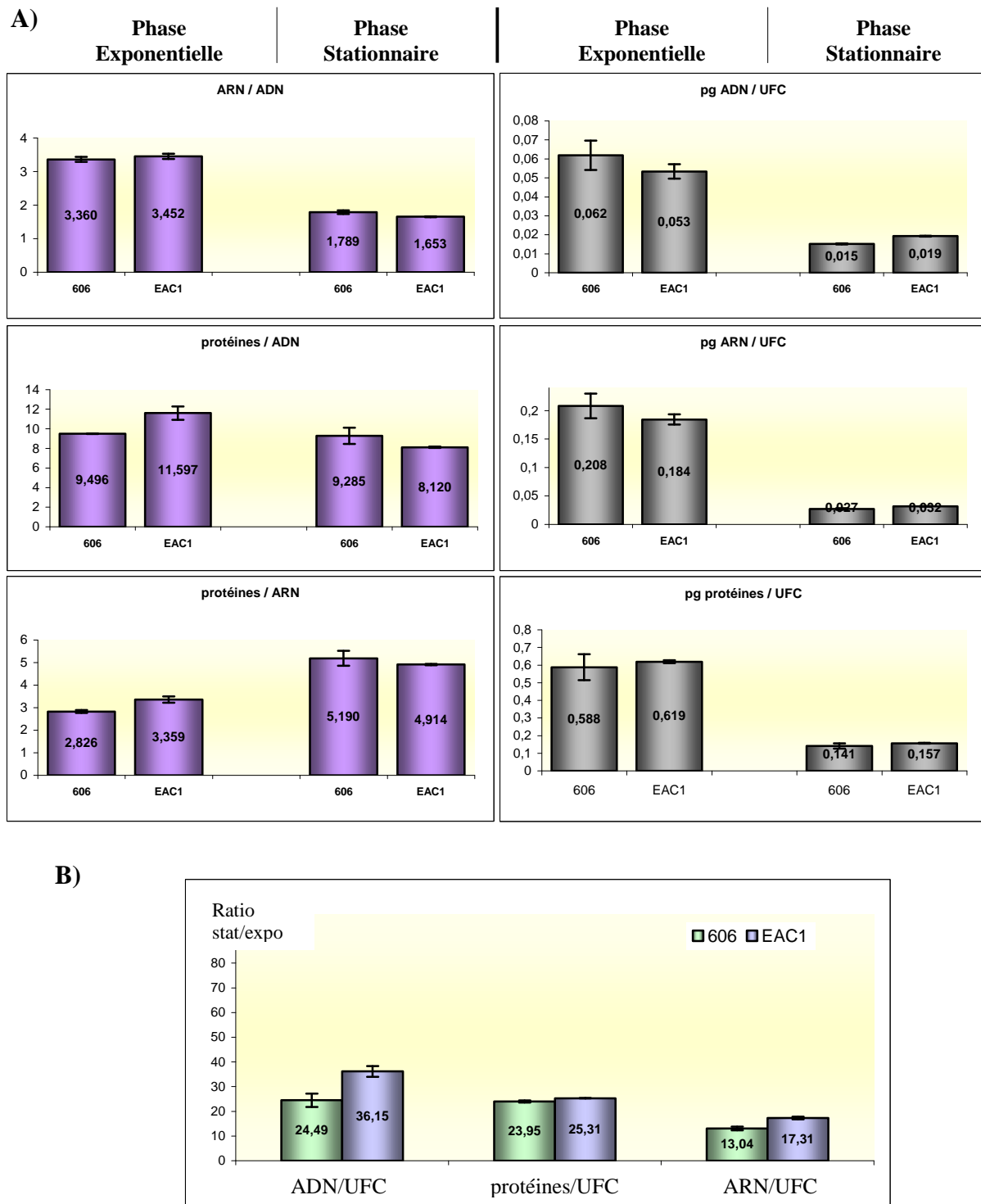
Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 41. Les graphiques de gauche représentent les ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN observés dans les 4 souches en phase de croissance exponentielle (histogrammes de gauche) et en phase stationnaire (histogrammes de droite). Ces ratios sont similaires dans les 4 souches, hormis une différence observée en phase exponentielle chez deux des mutants *spoT* qui présentent une augmentation des ratios protéines/ADN et protéines/ARN par rapport à l'ancêtre. De plus, la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire s'accompagne d'une diminution forte du ratio ARN/ADN, de l'ordre de 50%, et d'une diminution plus légère du ratio protéines/ADN. Ces diminutions sont identiques dans les 4 souches et reflètent donc un contrôle stringent qui semble non affecté par les mutations de *spoT*. Cependant, un examen plus détaillé des concentrations intracellulaires d'ADN, ARN et protéines révèle des différences notables (Fig.41A). Les graphiques de droite représentent les concentrations par cellule en ADN, ARN et protéines des différentes souches, cultivées en milieu DM250 glucose, en fonction des phases de croissance. Le contrôle stringent est à nouveau nettement détecté pour les 4 souches. En effet, la transition de la phase exponentielle à la phase stationnaire se caractérise par une forte diminution des concentrations intracellulaires en ADN, ARN et protéines (Fig.41A). Cependant, la diminution de concentration des 3 types de



**Figure 42 : Effets des mutations *spoT* sur la composition en ADN, ARN et protéines des cellules cultivées en milieu MOPS glucose. A) Composition cellulaire en ADN, ARN et protéines des souches *spoT<sup>anc</sup>* et *spoT<sup>évol</sup>* selon les phases de croissance. Les graphiques de droite représentent les concentrations en ADN, ARN et protéines exprimées en pg/UFC. Les graphiques de gauche indiquent les ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN de chaque souche. Pour tous les graphiques, les 3 histogrammes de gauche représentent les valeurs obtenues en phase de croissance exponentielle ( $DO_{600} \approx 0,15$ ), tandis que ceux de droite indiquent les valeurs obtenues en phase stationnaire au bout de 24h. B) Pourcentage de macromolécules organiques en phase stationnaire (stat) par rapport à la phase de croissance exponentielle (expo). Les étiquettes de données sont indiquées à l'intérieur des histogrammes.**

macromolécules, calculée par UFC, est moins prononcée pour les 3 souches portant les allèles évolués de *spoT* que pour la souche portant l'allèle ancestral de *spoT*. Le fait que ceci soit observé pour les 3 types de constituants cellulaires explique qu'aucune différence n'ait été observée entre les 4 souches par le calcul des ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN en phase stationnaire. Le contenu intracellulaire est donc plus important en phase stationnaire suite à la présence des allèles *spoT* évolués. Le calcul des ratios de la concentration en ADN, ARN et protéines entre phase stationnaire et phase exponentielle reflète parfaitement ces différences (Fig.41B), les 3 souches portant les allèles évolués de *spoT* se comportant de façon similaire. Les mutations *spoT* semblent donc entraîner un relâchement du contrôle stringent lors de la transition vers la phase stationnaire, malgré l'absence de différences dans les niveaux de (p)ppGpp. Cependant, les mesures des niveaux de (p)ppGpp ont été réalisées en milieu MOPS glucose et non pas en milieu DM250 glucose (section II.3.1). Nous avons donc également réalisé ces mesures de concentrations intracellulaires en ADN, ARN et protéines en milieu MOPS glucose (Fig.42).

Trois cultures indépendantes des souches 606, NAP1 et NAP9 ont été effectuées en milieu MOPS glucose. Des échantillons ont été prélevés en phase de croissance exponentielle, à une densité optique à 600nm d'environ 0,15, ainsi qu'en phase stationnaire après 24h d'incubation. Les concentrations en ADN, ARN, protéines et cellules de chaque échantillon ont été mesurées de la même façon que précédemment. Les ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN sont similaires quel que soit le contexte génétique et les 2 premiers ratios diminuent lors de la transition en phase stationnaire. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en milieu DM25 glucose. Comme dans le milieu DM250 glucose, la concentration de chaque macromolécule en phase stationnaire par rapport à la phase exponentielle est deux fois plus élevée chez les souches portant les allèles évolués de *spoT* par rapport à la souche ancestrale (Fig 42B). Les allèles évolués de *spoT* semblent donc provoquer un relâchement du contrôle stringent, sans modification des niveaux de (p)ppGpp. Bien que le même phénomène soit observé dans les deux milieux de culture, les raisons en sont différentes. En effet, en DM250 glucose, cela était dû essentiellement à des concentrations intracellulaires plus élevées en phase stationnaire dans les souches portant les allèles évolués de *spoT* (Fig.41A). En revanche, en milieu MOPS glucose, cela est dû à une forte diminution des différentes concentrations intracellulaires en phase exponentielle chez les souches portant les allèles évolués de *spoT* par rapport à l'ancêtre, alors que les concentrations sont équivalentes pour toutes les souches en phase stationnaire (Fig 42A). La raison de cette différence n'est pas connue. L'ensemble de ces résultats suggère cependant



**Figure 43 : Effets de la mutation bénéfique *topA*, apparue dans la population Ara-1, sur la composition en ADN, ARN et protéines de cellules cultivées en milieu DM250 glucose. A) Composition cellulaire en ADN, ARN et protéines de la souche ancêtre 606 et de la souche EAC1 correspondant à 606 portant l'allèle *topA* de la population Ara-1. Les graphiques de droite représentent les concentrations en ADN, ARN et protéines exprimées en pg/UFC. Les graphiques de gauche indiquent les ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN de chaque souche. Pour tous les graphiques, les 2 histogrammes de gauche représentent les valeurs obtenues en phase de croissance exponentielle ( $DO_{600} \approx 0,15$ ), tandis que ceux de droite indiquent les valeurs obtenues en phase stationnaire au bout de 24h. B) Pourcentage de macromolécules organiques en phase stationnaire (stat) par rapport à la phase de croissance exponentielle (expo). Les étiquettes de données sont indiquées à l'intérieur des histogrammes.**

que les mutations *spoT* provoquent un déséquilibre du contrôle stringent et ce, sans modifier les niveaux intracellulaires de (p)ppGpp. Ce phénomène atteint son paroxysme en milieu MOPS glucose où les concentrations intracellulaires en ADN, ARN et protéines sont quasiment identiques en phases exponentielle et stationnaire chez les mutants, qui semblent donc « bloqués » en phase exponentielle (Fig.42A).

Il est possible que les différences observées au niveau du contenu intracellulaire des mutants *spoT* ne soient pas directement liées aux mutations *spoT* mais plutôt à l'augmentation du taux de croissance qu'elles confèrent. Selon cette hypothèse, toute mutation bénéfique produirait les mêmes effets. Nous avons choisi d'étudier la mutation *topA*, qui a été mise en évidence dans la souche Ara-1 (Crozat *et al.*, 2005) et confère un avantage de 13% (voir résultats, chapitre IV), similaire à celui procuré par les allèles mutants de *spoT*. Le contenu intracellulaire des souches portant les allèles ancestral (606) et évolué (EAC1) de *topA* a été analysé en milieu DM250 glucose de la même façon que précédemment (Fig.43). La souche EAC1 présente beaucoup moins de différences de composition cellulaire que les mutants *spoT* par rapport à la souche ancêtre (Fig.43A). Le contrôle stringent semble légèrement dérégulé dans la souche mutante, mais de façon beaucoup moins importante que dans les mutants *spoT* (Fig.43B). Ainsi, la majorité des différences observées dans les souches A, NAP1 et NAP9 par rapport à la souche ancêtre 606 semble directement liée aux mutations *spoT*.

## **II.4. Effets de la mutation *spoT* de la population Ara-1 sur la transcription globale**

Cooper *et al.* (2003) ont analysé, au moyen de puces à ADN, la transcription globale des souches 606 et A, cultivées en milieu DM25 glucose jusqu'en milieu de phase de croissance exponentielle, période à laquelle les mutations *spoT* confèrent un avantage important. Ils se sont focalisés sur les changements de transcription provoqués par la mutation *spoT*<sup>-1</sup> et conservés après 20 000 générations d'évolution expérimentale. Nous avons utilisé leurs données afin d'analyser de façon plus approfondie les effets de la mutation *spoT* de la population Ara-1 sur la transcription globale des gènes (Tableau 8). Les profils observés révèlent un niveau de complexité élevé, avec la transcription de 341 gènes modifiée de façon significative par la présence de la mutation *spoT* de la population Ara-1 (test de Student sur 4 expériences indépendantes  $p < 0,05$ ). Lorsque l'on considère un intervalle de confiance à 90%,

648 gènes présentent une transcription modifiée dans la souche A par rapport à 606. Les gènes dont la transcription est modifiée appartiennent à toutes les catégories fonctionnelles possibles. D'une part, le métabolisme de nombreux composés est modifié. La dégradation des composés carbonés, la glycolyse ainsi que le cycle des acides tricarboxyliques semblent favorisés. C'est également le cas de la synthèse de glycogène et de la respiration anaérobie. La mutation *spoT*<sup>-1</sup> semble également favoriser l'adaptation à divers stress (choc thermique, stress osmotique et oxydatif), et réprimer un certain nombre de gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle qui n'est pas utile dans ces conditions et qui représente donc un coût important. La répression des gènes *flg* pourrait donc participer au bénéfice apporté par la mutation *spoT*<sup>-1</sup>. D'autre part, cette mutation active de nombreux gènes impliqués dans le transport des acides aminés, des sources de carbone et d'autres molécules, ainsi que la sécrétion des peptides et protéines (Tableau 8). Enfin, l'expression de certains régulateurs transcriptionnels est modifiée dans la souche A. L'expression de *oxyR*, *arcA*, *ada*, *lon* augmente, tandis que la transcription de *lexA*, *hnr*, *lrp* et *hns* semble diminuer.

Globalement, la mutation *spoT* de la population Ara-1 a des effets très pleiotropes et globaux sur la transcription des gènes. La souche A serait plus résistante aux différents stress environnementaux qu'elle peut rencontrer et présenterait un métabolisme plus actif que l'ancêtre 606. Les échanges avec l'extérieur seraient favorisés par la mutation *spoT*<sup>-1</sup>, et la synthèse de structures inutiles serait inhibée, ce qui permettrait d'économiser de l'énergie. Certains changements peuvent être à l'origine de l'effet bénéfique des différentes mutations *spoT*. Une analyse des profils de transcription des souches A, NAP1 et NAP9 permettrait de cibler les changements d'expression communs provoqués par ces différentes mutations et de déterminer l'origine de leur bénéfice.

D'autre part, nous avons comparé les gènes dont la transcription est modifiée par la mutation *spoT*<sup>-1</sup> à ceux connus pour être régulés par (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996, Traxler *et al.*, 2006) (Tableau 8). Dans certains cas, la présence de la mutation *spoT* de la population Ara-1 semble aller dans le sens d'une augmentation du niveau de (p)ppGpp (exemples : *dnaK*, *glnA*, *lysC*, *argC*,...), mais ceci est loin d'être une généralité. Aucune corrélation frappante n'est observée entre les effets de la mutation *spoT*<sup>-1</sup> et les effets de (p)ppGpp sur l'expression des gènes. Ceci va dans le sens de l'absence d'effet détectable des mutations *spoT* sur le niveau de (p)ppGpp. Cependant, il est clair que ces mutations *spoT* ont des conséquences importantes sur l'expression globale des gènes, par un mécanisme probablement indépendant du niveau de (p)ppGpp.

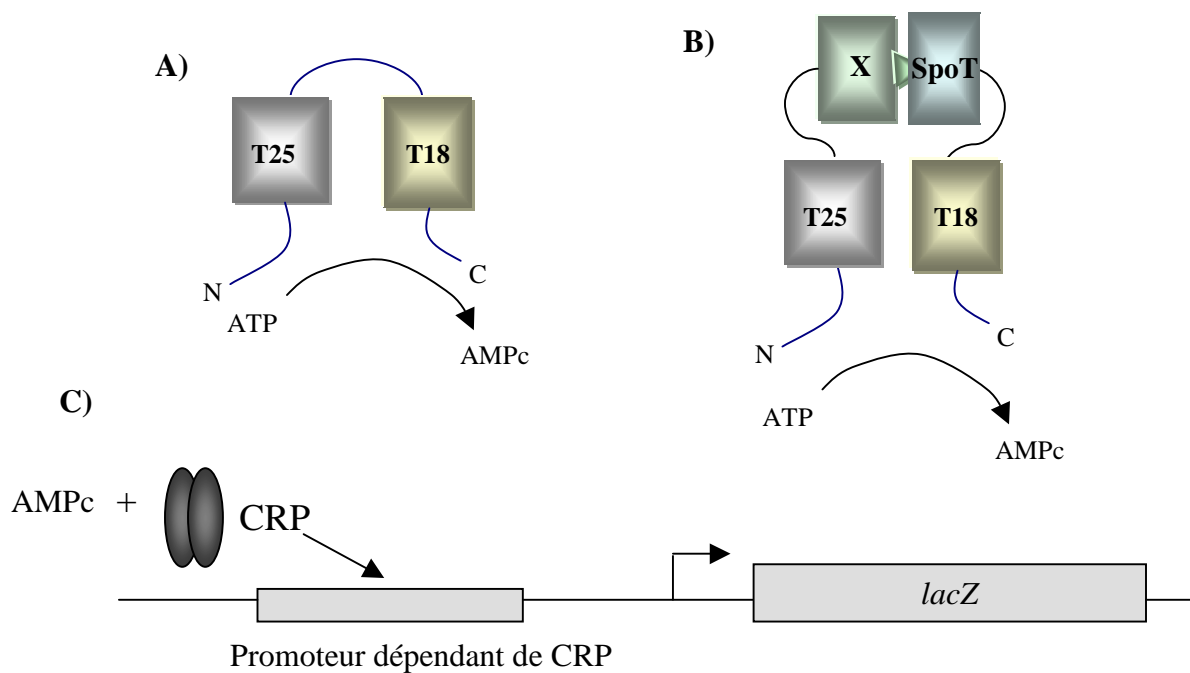


Processus touchés		Gènes	Effets de la mutation <i>spoT</i> <sup>-1</sup>	Effets connus de (p)ppGpp
Métabolisme des acides aminés	Biosynthèse des acides aminés	<i>glnA, metA, lysC, argG, argC, dapB</i> <i>metB, trpR</i> <i>leuB, leuL, leuD, serB, glyA, ilvH, pheA, alr</i> <i>aspC, glnB, metR, serC</i>	+ +* - -*	<i>glnA, lysC, dapB, argC</i> : + <i>ilv</i> : +
	Dégradation des acides aminés lysine et thréonine	<i>tdcA</i> <i>cadA, cadC, tdcB, tdcR</i> <i>ansA</i>	+ +* -	
Métabolisme des composés carbonés	Dégradation des sources de carbone	<i>araB, malM, mtlD, uxuA, celD, rbsR, sfsA, lyxK</i> <i>araA, araC, poxB, ascB, rbsK, galU, prkB</i> <i>galE</i>	+ +* -	
	Synthèse de glycogène	<i>glgS, glgC</i>	+	
Métabolisme d'autres composés	Métabolisme des nucléotides	<i>gmk, pyrB, hpt, dut</i> <i>guaC, guaA, deoA, deoB</i> <i>purF, purC, apaH</i> <i>dcd</i>	+ +* - -*	<i>pyrB</i> : - <i>guaC</i> : - <i>deoA</i> : +
	Métabolisme des acides gras	<i>cdh, tesB, lgt, fabI</i> <i>fabG, plsC</i>	+* -	<i>pls</i> : -
	Métabolisme du soufre	<i>cysH, cysJ, cysC, cysI</i>	- -*	
Métabolisme central	Transport d'électrons	<i>atpA, yhjA, nuoM</i> <i>cybC</i>	+* -	
	Respiration anaérobie	<i>nirD, nrfC</i> <i>nirB, fdoH, frdD, frdA</i> <i>nrfG</i> <i>narV, narW</i>	+ +* - -*	
	Cycle des acides tricarboxyliques	<i>sdhC, fumB, farR</i>	+	
	Glycolyse	<i>pfkA, tpiA</i> <i>pykF</i>	+ +*	
Adaptation à des stress	Résistance au choc thermique, aux stress osmotique, oxydatif et autres	<i>htpX, inaA, betI, katE</i> <i>sodC, marA</i> <i>treR</i>	+ +* -*	

	Chaperones	<i>dnaJ, dnaK, cbpA, ecpD</i> <i>mopA</i>	+	<i>dnaK</i> : +
Motilité	Flagelle	<i>fliJ, fliK, fliO, fliP, fliQ</i> <i>flgE, flgF, flgN, flgG, flgA, flgB, flgC, flgD,</i> <i>fliF</i> <i>flgJ</i>	+* - -*	<i>flgE</i> : -
	Fimbriae	<i>fimZ</i>	-	
Composition de l'enveloppe	Membrane externe	<i>ompF, ompT</i>	-	
	Membrane interne	<i>gusC</i>	+	
	Peptidoglycane	<i>mltA</i> <i>murF, ddlB</i> <i>murE, mepA, pal, lpp</i>	+ +* -	
Expression des gènes	Régulateurs transcriptionnels	<i>oxyR, arcA, sspB, ada</i> <i>lon, rstB, tyrR</i> <i>lexA, hrsA</i> <i>lrp, hns</i>	+ +* - -*	
	Transcription, Traduction	<i>rpoB</i> <i>infA</i>	+* +*	- -
	Métabolisme ARNt	<i>truB, def, lysU</i> <i>glyQ</i> <i>queA, cysS</i> <i>ppiB</i>	+ +* - -*	-
	Protéines ribosomiques	<i>rplE</i> <i>rpsU</i> <i>rpmH, rplU, rpsK, rpsH, rpsO</i>	+ +* -*	- - -
Métabolisme de l'ADN	Synthèse d'ADN	<i>polB</i> <i>dnaN, holC, holA</i>	+* -	
	Hélicases	<i>recQ, dnaB</i>	-	
	Dégradation de l'ADN	<i>mcrB</i> <i>endA</i> <i>sbcB</i>	+ - -*	
	Autres	<i>recN</i> <i>rssB</i>	+* -	
	Transport d'acides aminés	<i>argT, gltK, artJ, livG, tdcC, gltL, lysP</i> <i>livH, sdaC, potB, cycA, tnaB, mtr</i>	+ +*	

Transport	Sécrétion de protéines	<i>secG, lspA, secB, hofG</i> <i>dppD, secA</i> <i>oppA</i> <i>lepB</i>	+	
			+*	
			-*	
			-	
Transport	Transport de carbohydrates, acides organiques...	<i>melB, fadL, gabP, fucP, ugpA, araE, dcuA,</i> <i>rbsA, kgtP</i> <i>xapB, cmtB, exuT, gntT</i>	+	
			+*	
	Transport de petites molécules	<i>nupC, exbD, trkA, exbB</i> <i>ptsO, pitB, msbA, panF, kup, fecR, nikC, phnD</i>	+	
			+*	
Systèmes PTS		<i>frwB, agaC, malX, srlB</i> <i>glvB</i>	+	
			+*	

**Tableau 8 : Effets de la mutation *spoT* de la population Ara-1 sur la transcription globale des gènes.** La transcription globale des souches 606 et A cultivées en milieu DM25 glucose jusqu'en milieu de phase de croissance exponentielle a été analysée au moyen de puces à ADN (Cooper *et al.*, 2003). Ces expériences ont été réalisées 4 fois de façon indépendante. Les résultats obtenus ont été analysés par un test statistique de Student avec un intervalle de confiance de 95 ou 90%, permettant de mettre en évidence les différences de transcription significatives entre l'ancêtre 606 et la souche A. Ce tableau présente les gènes dont l'expression est activée (+) ou réprimée (-) dans la souche A, portant la mutation *spoT* de la population Ara-1 (avant-dernière colonne). Les gènes dont l'expression est modifiée de la même façon dans un clone évolué isolé de la population Ara-1 à 2000 générations sont indiqués en gras. Cette liste n'est pas exhaustive, elle exclut les gènes non classés, codant des protéines hypothétiques. Les modifications signalées par un astérisque (\*) présentent une valeur  $p < 0,1$  (intervalle de confiance de 90%). Autres modifications :  $p < 0,05$  (intervalle de confiance de 95%). Les gènes connus pour être régulés par (p)ppGpp (Cashel *et al.*, 1996 ; Traxler *et al.*, 2006) ainsi que l'effet de (p)ppGpp sur leur transcription sont indiqués dans la colonne de droite (+ : gènes activés par (p)ppGpp, - : gènes réprimés par (p)ppGpp).



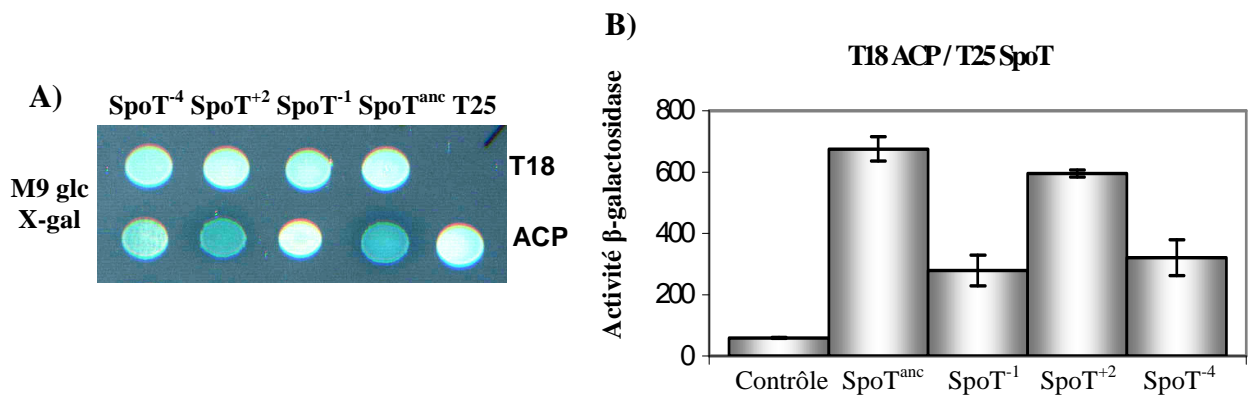
**Figure 44 : Principe de l'expérience de double hybride bactérien (Karimova *et al.*, 1998), permettant de mesurer les interactions entre deux protéines.** Ce système est basé sur la complémentation fonctionnelle de deux fragments de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, appelés T25 et T18. A) L'enzyme est fonctionnelle car les deux domaines sont proches, et elle synthétise de l'AMPc. B) Chaque domaine est fusionné à un des deux partenaires potentiels, ici SpoT et X. Les deux protéines interagissent, ce qui permet le rapprochement des deux domaines et la synthèse d'AMPc. C) L'AMPc synthétisé active la protéine CRP, qui va activer un gène rapporteur (*lacZ*). Une mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase permet d'évaluer la force de l'interaction entre les deux partenaires.

## II.5. Effets des mutations *spoT* sur les interactions SpoT-ACP et SpoT-CgtA

Des études récentes par purification par affinité en tandem (TAP-Tag) suggèrent une interaction entre les protéines SpoT et ACP (Gully *et al.*, 2003 ; Butland *et al.*, 2005), une protéine majeure impliquée dans la biosynthèse des acides gras. Une autre étude par coimmunoprécipitation et double hybride de levure a démontré une interaction entre les protéines SpoT et CgtA (Wout *et al.*, 2004), protéine essentielle impliquée dans de nombreux processus, notamment la réplication, la réparation de l'ADN et la maturation des ribosomes (Czyz et Wegrzyn, 2005).

Les mutations *spoT* n'affectant pas l'activité enzymatique de SpoT, le bénéfice qu'elles confèrent pourrait être dû à des variations d'interactions entre SpoT et ses différents partenaires. Afin de tester cette hypothèse, les interactions entre les protéines SpoT ancestrale et évoluées et les protéines ACP et CgtA ont été analysées par des expériences de double hybride bactérien (Karimova *et al.*, 1998), en collaboration avec Emmanuelle Bouveret et Aurelia Battesti (LISM, Marseille). Le système de double hybride bactérien repose sur la complémentarité fonctionnelle de deux fragments de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, appelés T25 et T18 (Fig.44). Lorsque ces deux fragments sont associés, directement ou par le biais de protéines de fusion qui interagissent, une certaine quantité d'AMPc est synthétisée, proportionnelle à la force de l'interaction des deux fragments. L'AMPc active alors la protéine CRP, qui elle-même active l'expression de ses gènes cibles, tels que *lacZ*, codant la  $\beta$ -galactosidase. Il est alors possible de mesurer la force de l'interaction entre deux partenaires protéiques de manière indirecte, en évaluant l'activité  $\beta$ -galactosidase sur milieu solide Mc Conkey lactose ou contenant du X-gal, ou en dosant cette activité avec de l'ONPG.

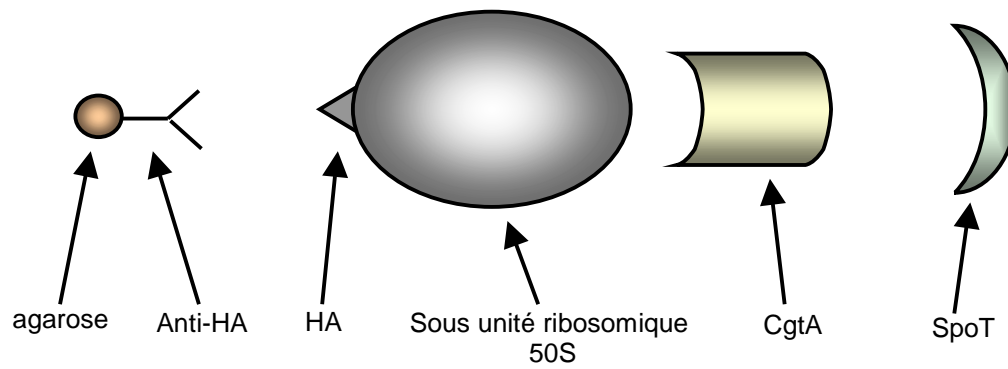
Les allèles *spoT* ancestral et évolués ont été clonés dans le plasmide codant le fragment T25, de façon à produire 4 protéines de fusion SpoT<sup>anc</sup>-T25, SpoT<sup>-1</sup>-T25, SpoT<sup>+2</sup>-T25 et SpoT<sup>-4</sup>-T25. Les gènes *cgtA* et *acpP* ont quant à eux été clonés dans le plasmide codant le fragment T18, de façon à produire les protéines de fusion CgtA-T18 et ACP-T18. Ceci a également été réalisé de façon réciproque, de façon à produire les protéines de fusion SpoT<sup>anc</sup>-T18, SpoT<sup>evol</sup>-T18, ACP-T25 et CgtA-T25. Les partenaires protéiques potentiels fusionnés aux fragments T25 et T18 ont été exprimés dans la souche DHP1, délétée du gène *cya*, codant l'adénylate cyclase. Le rapprochement des fragments T18 et T25 lors de l'interaction des partenaires permet ainsi une complémentarité fonctionnelle de cette souche. Trois cultures indépendantes des souches DHP1 contenant les différents couples de plasmides ont été réalisées en LB. Après 24h de culture, des mesures d'activités  $\beta$ -galactosidase ont été



**Figure 45 : Effets des mutations *spoT* sur l'interaction de SpoT avec ACP, évaluée par des expériences de double hybride bactérien.** Les différentes protéines SpoT sont fusionnées au domaine T25 de l'adénylate cyclase de *B. pertussis*, tandis que ACP est fusionnée au domaine T18. Les différentes constructions sont exprimées chez la souche DHP1 (*cya*<sup>-</sup>), cultivée en milieu LB. Les activités β-galactosidase sont mesurées en phase stationnaire (B), et estimées par culture des différentes souches sur milieu solide M9-glucose contenant du X-gal (A). Il semble que les mutations *spoT* des populations Ara-1 et Ara-4 diminuent l'interaction SpoT-ACP.

effectuées sur chaque culture, et 10µL de culture ont été déposés sur milieu minimum solide M9 contenant du X-gal. La figure 45 présente les résultats obtenus entre les protéines SpoT-T25 et ACP-T18. Au préalable, nous avons montré que les protéines de fusion SpoT-T25 n'interagissent pas avec le fragment T18 seul, de la même façon que la protéine de fusion ACP-T18 n'interagit pas avec le fragment T25. Nous avons par ailleurs détecté une interaction entre les protéines SpoT<sup>anc</sup>-T25 et ACP-T18 (Fig.45), confirmant les résultats qui avaient été obtenus par la technique TAP-tag (Gully *et al.*, 2003). L'activité β-galactosidase est similaire lorsque les protéines ACP-T18 et SpoT<sup>+2</sup>-T25 sont exprimées. En revanche, les activités β-galactosidase sont diminuées lorsque chacune des protéines SpoT<sup>-1</sup>-T25 et SpoT<sup>-4</sup>-T25 est exprimée avec la protéine ACP-T18 (Fig.45), ce qui suggère des interactions plus faibles pour ces deux protéines mutantes. Tous ces résultats ont été confirmés par l'analyse des protéines de fusion réciproques SpoT-T18 et ACP-T25 (résultats non montrés). L'analyse du niveau d'expression des protéines de fusion SpoT-T25 et SpoT-T18 par Western-blot suggère que ces résultats ne sont pas dus à une expression différentielle des différentes protéines de fusion (résultats non montrés). La protéine SpoT de la population Ara-1 est modifiée à son extrémité C-terminale au niveau du résidu lysine 662, qui est remplacé par un résidu isoleucine. La protéine SpoT de la population Ara-4 est modifiée au niveau du résidu tyrosine 389, situé dans le domaine TGS, qui est remplacé par un résidu cystéine. Ces deux résidus acides aminés semblent donc impliqués dans l'interaction de SpoT avec la protéine ACP. En revanche, cela n'est pas le cas du résidu arginine 575, puisque la protéine SpoT de la population Ara+2, modifiée au niveau de cet acide aminé, présente une interaction inchangée avec ACP. L'interaction entre SpoT et ACP pourrait constituer un lien entre le métabolisme des acides gras et la réponse stringente.

Les mêmes expériences, réalisées avec les protéines SpoT<sup>anc</sup>-T25 et CgtA-T18 n'ont pas permis de détecter d'interaction. A l'origine (Wout *et al.*, 2004), cette interaction avait été mise en évidence en utilisant un système de double hybride de levure (Kolonin *et al.*, 2000). Nous avons donc décidé d'utiliser cette approche. Les différents allèles ancestral et évolués de *spoT* ont été clonés dans le plasmide pJG4-5, codant le domaine activateur de transcription (AD) de la protéine B42, permettant l'expression de protéines de fusion SpoT<sup>anc</sup>-B42(AD) et SpoT<sup>evol</sup>-B42(AD). Le gène *cgtA* a été cloné dans le plasmide pEG202, codant le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du facteur de transcription LexA, résultant en l'expression de la protéine de fusion CgtA-LexA(DBD). De façon réciproque, la protéine ancestrale SpoT a été fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de LexA et la protéine CgtA a été fusionnée au domaine activateur de transcription de B42. Les plasmides compatibles



**Figure 46 : Principe des tests d'interactions entre SpoT, CgtA et les sous-unités 50S des ribosomes.** La protéine CgtA interagit avec la sous-unité 50S des ribosomes. Des sous-unités ribosomes 50S marquées par une étiquette hémagglutinine (HA) sont purifiées sur gradients de sucrose, puis fixées à une résine d'agarose comportant des anticorps dirigés contre l'étiquette HA. Il est alors possible de tester l'interaction de protéines diverses avec les sous-unités ribosomiques 50S. Ici CgtA et SpoT ont été marquées à leur extrémité N-terminale avec une étiquette histidine et MBP respectivement.



pJG4-5 et pEG202, sur lesquels ont été clonés les différents allèles ont été introduits dans deux souches haploïdes de levure de type sexuel opposé et pouvant fusionner pour donner une souche diploïde portant les deux plasmides. Les deux partenaires protéiques potentiels fusionnés aux domaines B42(AD) et LexA(DBD) ont ainsi pu être exprimés dans la même souche de levure. Par cette technique, l'interaction entre les partenaires permet la reconstitution d'un facteur de transcription actif contenant à la fois les domaines de liaison à l'ADN de LexA et d'activation de la transcription de B42 (Kolonin *et al.*, 2000). Le domaine B42(AD) est également fusionné à une séquence NLS, permettant la translocation du groupement protéique à l'intérieur du noyau. Le gène *lacZ* est placé sous contrôle d'une séquence reconnue par le facteur LexA (Kolonin *et al.*, 2000). La force de l'interaction entre les partenaires protéiques peut donc être évaluée par mesure de l'activité  $\beta$ -galactosidase. Par cette méthode, l'interaction entre SpoT<sup>anc</sup> et CgtA a pu être détectée. Cependant, aucune différence d'interaction n'a été mise en évidence lorsque CgtA a été mise en présence des protéines SpoT mutantes. Les résidus de SpoT mutés ne sont donc probablement pas impliqués dans l'interaction entre SpoT et CgtA. Cependant, il a été montré récemment que CgtA interagissait avec la sous-unité 50S des ribosomes (Wout *et al.*, 2004 ; Sato *et al.*, 2005) et était impliquée dans leur maturation. De plus, la protéine SpoT a souvent été purifiée avec des fractions ribosomiques, mais aucune interaction directe ou indirecte avec les ribosomes n'a pu être détectée (Cashel *et al.*, 1996). Avec l'aide de Michael Cashel, nous avons tenté de mettre au point un système permettant de détecter d'une part une éventuelle interaction de SpoT avec les ribosomes via la protéine CgtA, et d'autre part des différences d'interaction avec les protéines SpoT mutantes (Fig.46). Nous disposons d'une souche bactérienne dans laquelle le gène *rplA*, codant la protéine ribosomique L1 de la sous-unité 50S, a été fusionné à une séquence codant une étiquette hémagglutinine (HA). Les ribosomes issus de cette souche ont été purifiés sur coussins de sucrose, puis les sous-unités 50S, comportant l'étiquette HA, ont été séparées des sous-unités 30S par gradients de sucrose. D'autre part, le gène *cgtA* a été cloné dans le plasmide pET28 (Novagen) permettant l'expression d'une protéine de fusion His<sub>6</sub>-CgtA, les 6 résidus histidine étant fusionnés à l'extrémité N-terminale de CgtA. Les gènes codant les différents allèles de *spoT* ont été clonés dans le plasmide pMalc2e (NEB), permettant l'expression de protéines de fusion MBP-SpoT. Le principe de cette expérience consiste à fixer les sous-unités ribosomiques 50S sur une résine d'agarose comportant des anticorps anti-HA, puis d'y fixer la protéine CgtA et d'évaluer si les différentes protéines SpoT sont capables de se fixer sur ce type de complexe (Fig.46). Nous nous sommes malheureusement heurtés à un problème de fixation aspécifique des protéines His<sub>6</sub>-CgtA et

MBP-SpoT sur la résine anti-HA. Nous avons essayé de résoudre ce problème par blocage de la résine au moyen d'albumine de sérum bovin (BSA), mais cela n'a pas apporté d'amélioration. De plus, la protéine CgtA ne semble pas mieux se fixer sur la résine sur laquelle sont immobilisées les sous-unités ribosomiques 50S que sur la résine seule. Cette approche ne nous a donc pas non plus permis de mettre en évidence une interaction entre la protéine CgtA et les ribosomes, ni entre CgtA et SpoT.

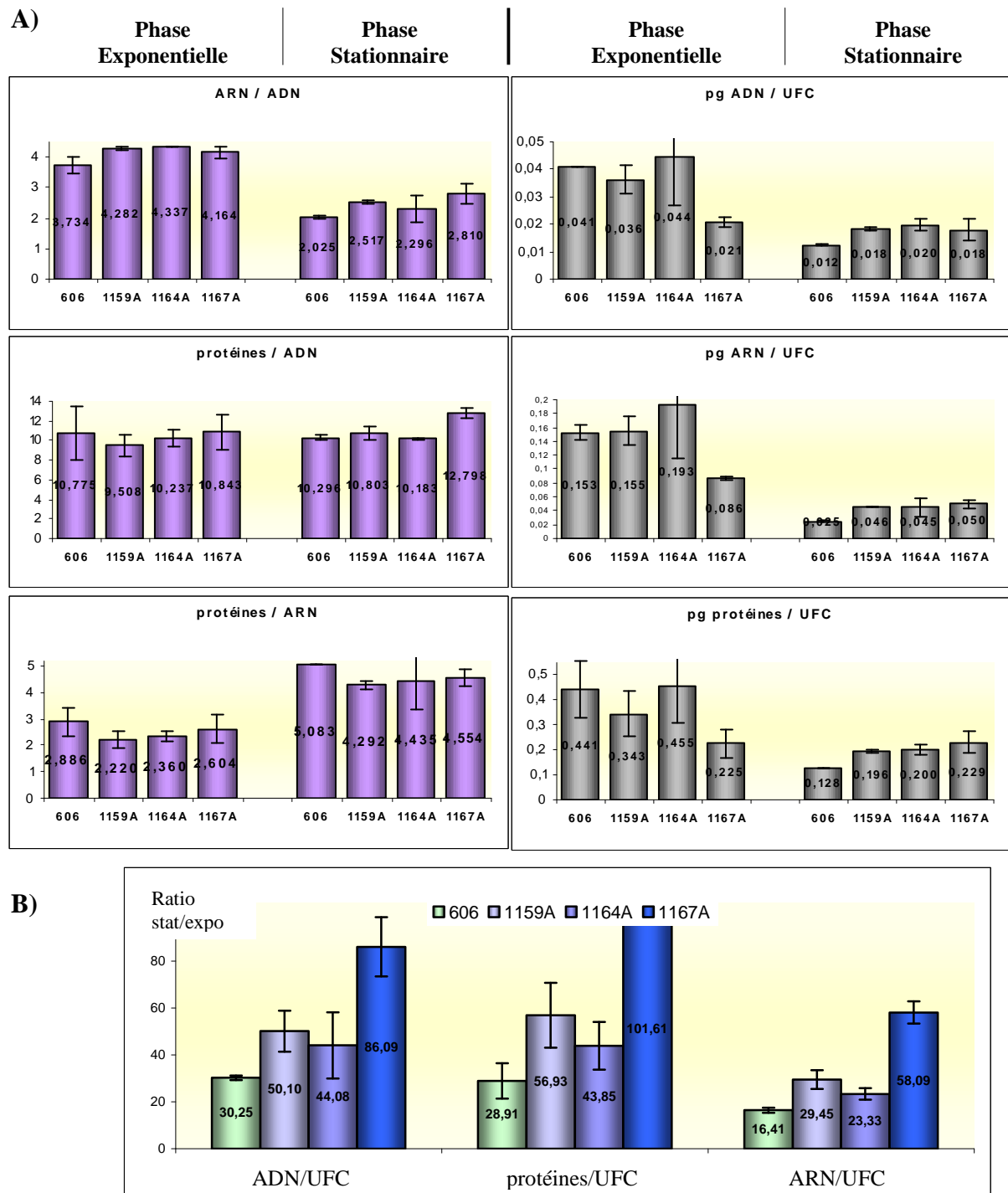
## **II.6. Participation des mutations *spoT* à l'évolution des bactéries**

Les mutations *spoT* ont été fixées dans les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 bien avant 2000 générations (voir section V.2.1), c'est-à-dire au moment de l'augmentation de fitness la plus forte. Nous avons souhaité déterminer la contribution des mutations *spoT* à l'adaptation des bactéries au cours des 2000 premières générations d'évolution expérimentale. Pour cela, nous avons comparé les effets phénotypiques des mutations *spoT* dans le contexte ancestral (souches 606, A, NAP1 et NAP9) aux phénotypes observés chez un clone évolué isolé à 2000 générations dans chacune des 3 populations (Ara-1 : clone 1164A, Ara+2 : 1159A, Ara-4 : 1167A).

Les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 à 2000 générations présentent une augmentation de fitness de 23%, 15% et 23% respectivement par rapport à l'ancêtre. Après 10 000 générations d'évolution, le fitness est respectivement augmenté de 44%, 61% et 53%. Les mutations *spoT* apportent un bénéfice d'environ 10%, ce qui représente une part considérable du fitness observé à 2000 et à 10 000 générations. La réponse stringente constitue donc une cible importante de la sélection naturelle dans les conditions de l'évolution expérimentale.

Les cinétiques d'accumulation et de dégradation de (p)ppGpp ont été étudiées dans les clones évolués isolés à 2000 générations dans les 3 populations (résultats non montrés). De la même façon que pour les souches ancêtres portant les allèles évolués de *spoT*, aucune différence significative n'a été observée par rapport à l'ancêtre 606. L'adaptation des populations aux conditions de l'évolution expérimentale ne semble donc pas impliquer des modifications de niveau de (p)ppGpp.

Le niveau de transcription de *rpoS* a également été analysé dans les souches 1164A et 1159A. Comme pour les souches ancêtres portant les allèles évolués de *spoT* des populations Ara-1 et Ara+2, la transcription de *rpoS* est légèrement diminuée dans les clones évolués, de l'ordre de 20 et 30% respectivement. Aucune diminution supplémentaire d'expression de RpoS n'a donc été observée au cours du temps évolutif. Bien que cette faible



**Figure 47 : Evolution de la composition en ADN, ARN et protéines des cellules cultivées en milieu DM250 glucose. A) Composition cellulaire en ADN, ARN et protéines de clones isolés à 2000 générations dans les populations Ara-1 (1164A), Ara-4 (1167A) et Ara+2 (1159A) selon les phases de croissance. Les graphiques de droite représentent les concentrations en ADN, ARN et protéines exprimées en pg/UFC. Les graphiques de gauche indiquent les ratios ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN de chaque souche. Pour tous les graphiques, les 4 histogrammes de gauche représentent les valeurs obtenues en phase de croissance exponentielle ( $DO_{600} \approx 0,15$ ), tandis que ceux de droite indiquent les valeurs obtenues en phase stationnaire au bout de 24h. B) Pourcentage de macromolécules organiques en phase stationnaire (stat) par rapport à la phase de croissance exponentielle (expo). Les étiquettes de données sont indiquées à l'intérieur des histogrammes.**

diminution soit statistiquement significative et observée par différentes techniques, son rôle physiologique reste incertain (section II.3.3). Contrairement à d'autres expériences d'évolution expérimentale où *E. coli* a été adaptée à des cultures continues en chémostat (Notley-McRobb *et al.*, 2003), ou à des carences prolongées (Zambrano *et al.*, 1993), RpoS ne semble pas constituer une cible privilégiée de la sélection naturelle dans nos conditions d'évolution expérimentale.

La composition intracellulaire en ADN, ARN et protéines des clones évolués 1164A, 1167A et 1159A cultivés en DM250 glucose a été analysée selon le même protocole que précédemment (section II.3.4). Cela permet donc de comparer le contenu cellulaire des souches portant les mutations de *spoT* dans le contexte ancestral (section II.3.4) ou dans le contexte génétique évolué dans lequel elles sont apparues (Fig.47). Les résultats obtenus suggèrent que l'effet des mutations *spoT* sur la composition cellulaire est conservé à 2000 générations. En effet, bien que les rapports ARN/ADN, protéines/ADN et protéines/ARN soient très similaires dans les souches 606, 1164A, 1159A et 1167A, les concentrations cellulaires en ADN, ARN et protéines sont plus élevées dans les clones évolués en phase stationnaire que dans l'ancêtre. Les valeurs obtenues sont analogues à celles des souches ancestrales portant les différents allèles *spoT*. L'effet des mutations *spoT* est donc similaire, que ce soit dans le contexte ancestral ou évolué. Le clone évolué 1167A, isolé de la population Ara-4 à 2000 générations, présente cependant des effets plus importants. Le contrôle stringent semble donc également relâché dans les clones évolués à 2000 générations, probablement suite à la fixation des mutations *spoT* dans ces populations. Ce phénotype est donc à rajouter sur la liste des modifications phénotypiques parallèles qui caractérisent cette évolution expérimentale.

Nous avons également comparé le profil de transcription globale des gènes dans les souches A et 1164A, c'est-à-dire quand l'allèle *spoT*<sup>-1</sup> se situe dans un contexte génétique ancestral et évolué (Tableau 8) (Cooper *et al.*, 2003). La transcription de 64 gènes est modifiée de façon parallèle dans les souches A et 1164A par rapport à la souche ancêtre ( $p < 0,1$ ). Chez la souche A, la modification de transcription de 584 gènes par rapport à l'ancêtre n'est donc pas conservée chez la souche 1164A. Réciproquement, la modification de transcription de 571 gènes observée chez la souche 1164A n'est pas observée chez le mutant A. Ceci confirme que la mutation *spoT*<sup>-1</sup> n'explique qu'une partie des modifications observées dans les clones évolués. D'autre part, les gènes dont la transcription est modifiée à la fois dans les souches A et 1164A pourraient constituer des candidats pouvant expliquer l'effet bénéfique de la mutation *spoT* de la population Ara-1. Les changements conservés

concernent des gènes impliqués dans des fonctions très diverses. La perte d'expression de nombreux gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle est observée à la fois dans les contextes génétiques *spoT*<sup>-1</sup> ancestral et évolué (*flgA*, *flgB*, *flgC*, *flgD*, *flgE*, *flgG*, *fliF*) (Tableau 8). L'expression de la porine OmpF et de quelques protéines impliquées dans le transport de molécules et la sécrétion de protéines est modifiée de la même façon dans les souches A et 1164A. La mutation *spoT*<sup>-1</sup> a donc des effets importants sur la structure de la paroi (flagelle, membrane externe), réduisant ainsi probablement le coût énergétique lié à la synthèse du flagelle et modulant les échanges avec le milieu extérieur. L'expression des régulateurs transcriptionnels Ada et Hns ainsi que de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase est modifiée aussi bien dans la population Ara-1 à 2000 générations que dans la souche A. La mutation *spoT*<sup>-1</sup> a donc également des effets sur la transcription globale des gènes par modifications de l'expression de régulateurs globaux.

En conclusion, une grande partie des phénotypes conférés par les allèles *spoT* dans le contexte ancestral sont également observés dans les contextes évolués à 2000 générations. La combinaison de ces différents phénotypes est donc probablement à l'origine de l'augmentation du fitness conférée par les mutations *spoT*.

## II.7. Discussion

Le gène *spoT*, acteur majeur de la réponse stringente, est la cible de la sélection naturelle dans 8 populations sur 12 au cours de 20 000 générations d'évolution expérimentale chez *E. coli*. Ces mutations, apparues de façon parallèle, affectent soit le domaine non catalytique C-terminal de la protéine SpoT, dont la fonction est inconnue, soit le chevauchement entre les domaines de dégradation et de synthèse de (p)ppGpp, probablement impliqué dans la régulation des deux activités (voir introduction section III.2.4). Les 3 mutations *spoT* étudiées, mises en évidence dans les populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 et affectant le domaine C-terminal de SpoT, conduisent à des phénotypes similaires lorsqu'elles sont introduites dans le contexte génétique ancestral. Ces mutations ont été fixées très tôt dans l'évolution, au cours de la période de fort accroissement de fitness. Elles permettent d'améliorer considérablement le fitness des bactéries, de l'ordre de 10%, dans le milieu de l'évolution DM25 glucose mais également dans d'autres environnements (DM25 maltose, DM25 glycérol, MOPS glucose), et dans différents contextes génétiques (*relA*<sup>+</sup> et  $\Delta$ *relA*). Le bénéfice apporté par ces mutations semble strictement spécifique de la phase de croissance

exponentielle, la vitesse de division des cellules augmentant considérablement en leur présence. Les mutations *spoT* n'ont aucun impact détectable sur le métabolisme de (p)ppGpp. Ceci a été démontré de plusieurs façons indépendantes : par des étalements sur des milieux sélectifs permettant de détecter des différences de niveaux de (p)ppGpp, par des mesures biochimiques des taux d'accumulation et de dégradation de (p)ppGpp, et par mesures du niveau de (p)ppGpp au cours de la croissance bactérienne. Il faut également noter que le niveau d'expression de la protéine DksA, qui agit en synergie avec (p)ppGpp et amplifie ses effets, ne semble pas être influencé par les mutations de *spoT* (résultats non montrés). Ainsi, l'effet bénéfique des mutations *spoT* est indépendant du niveau de (p)ppGpp, ce qui a été confirmé par des mesures de fitness des souches portant les allèles évolués de *spoT* dans des contextes génétiques *relA*<sup>+</sup> et  $\Delta relA$ . Ceci suggère l'implication de *spoT* dans un nouveau mécanisme indépendant de son rôle dans le métabolisme de (p)ppGpp. Les mutations *spoT* ont également un faible effet de diminution de l'expression de *rpoS*, de façon indépendante de (p)ppGpp. Cet effet ne se répercute pas sur les gènes cibles de RpoS et ne semble donc pas avoir de signification physiologique dans les conditions expérimentales.

Le nouveau mécanisme, indépendant de (p)ppGpp, par lequel les mutations *spoT* apportent un avantage, pourrait tout de même être lié au processus de la réponse stringente ou totalement indépendant. Pour tenter de répondre à cette question, le contenu cellulaire en ADN, ARN et protéines des souches portant les allèles ancestral ou évolués de *spoT* a été analysé. La concentration en ARN reflète la quantité d'ARN stables, puisqu'ils représentent plus de 90% des ARN totaux. Or la synthèse des ARN stables est la principale cible du contrôle stringente exercé par (p)ppGpp en phase stationnaire. (p)ppGpp agit également en réprimant la réplication de l'ADN, la traduction, et en activant la protéolyse (introduction chapitre III), provoquant une diminution du niveau d'ADN et de protéines. Lors de la transition de la phase exponentielle vers la phase stationnaire, la concentration cellulaire en ADN, ARN et protéines diminue de façon moins importante dans les souches portant les allèles évolués de *spoT* que dans la souche portant l'allèle ancestral de *spoT*. Ceci suggère que les mutations *spoT* sont à l'origine d'un relâchement du contrôle stringente. Ce phénomène est observé quel que soit le milieu de culture utilisé et est spécifique des mutations *spoT*, puisqu'une autre mutation bénéfique (*topA*<sup>-1</sup>) ne conduit pas aux mêmes effets. Les mutations *spoT* interviennent donc dans le mécanisme de la réponse stringente sans affecter le niveau de (p)ppGpp. Ces phénotypes, semblables pour les 3 mutations *spoT* étudiées, ne permettent cependant pas d'expliquer le bénéfice qu'elles confèrent. En effet, cet avantage est spécifique de la phase exponentielle, et les mutations *spoT* entraînent peu de modifications de

concentrations intracellulaires en ADN, ARN et protéines au cours de cette phase. En revanche, le relâchement du contrôle stringent pourrait expliquer les effets néfastes des mutations *spoT* observés en phase stationnaire prolongée. En effet, les mutations *spoT* auraient tendance à « bloquer » les cellules en phase exponentielle, via un relâchement du contrôle stringent, ce qui provoquerait une diminution de fitness en phase stationnaire prolongée. Cela a été démontré dans le cas des souches dépourvues de (p)ppGpp pour lesquelles il n'y a pas d'inhibition de la transcription des ARN stables et de la synthèse des protéines ribosomiques lors de la transition vers la phase stationnaire (Magnusson *et al.*, 2003). En outre, ces souches (p)ppGpp<sup>0</sup> ne sont pas viables dans des conditions de carences prolongées, sauf en cas de fixation de mutations compensatrices (Cashel *et al.*, 1996). Bien entendu, les souches portant les allèles évolués de *spoT* étudiés ici présentent un effet nettement moins important et indépendant de (p)ppGpp. Mais surtout, l'effet néfaste lié au relâchement du contrôle stringent n'est pas détectable dans les conditions de l'évolution expérimentale où la phase stationnaire est trop courte. De plus, cet effet est contre-balançé par un effet bénéfique très important conféré en phase de croissance exponentielle.

Ce bénéfice n'est donc ni lié au niveau de (p)ppGpp, ni à des variations de concentrations intracellulaires en ADN, ARN et protéines. Nous avons donc décidé d'étudier l'impact des mutations *spoT*, d'une part sur la transcription globale des gènes (Cooper *et al.*, 2003), et d'autre part sur les interactions entre SpoT et d'autres partenaires protéiques.

La mutation *spoT* de la population Ara-1 a des effets importants sur la transcription des gènes en phase de croissance exponentielle. Elle semble favoriser le transport de nombreuses molécules ainsi que le métabolisme des composés carbonés tout en permettant aux cellules de mieux résister à divers stress. La mutation *spoT*<sup>-1</sup> réprime les opérons de biosynthèse du flagelle, dont l'expression est coûteuse et inutile dans les conditions de l'évolution expérimentale, où les cultures sont agitées, et ces effets sont conservés à 2000 et à 20 000 générations dans la population Ara-1. Il se pourrait donc que ce phénotype soit au moins en partie responsable du bénéfice apporté par la mutation *spoT*<sup>-1</sup> en phase exponentielle, en permettant aux cellules d'économiser de l'énergie. Il a par ailleurs été démontré que les cellules non flagellées étaient avantagées en culture liquide agitée (McNab, 1987). En outre, les opérons de biosynthèse du flagelle semblent être une cible de la sélection naturelle, leur inactivation procurant un avantage sélectif aux bactéries (Edwards *et al.*, 2002). Ceci pourrait être testé par la délétion de ces gènes dans le contexte génétique ancestral. Des expériences de compétition permettraient de connaître l'effet de la perte d'expression de ces gènes sur le fitness des bactéries dans les conditions d'évolution

expérimentale. Il est possible que ce gain énergétique soit à lui seul à l'origine de la totalité du bénéfice (10%) apporté par les mutations *spoT*, puisqu'il a été démontré que l'inactivation de gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle apporte un avantage pouvant aller de 6,4% à 25,7%, selon le gène touché (Edwards *et al.*, 2002). Une autre question importante concerne le mécanisme d'action de *spoT* sur la transcription globale, puisque nous avons montré que ces modifications de transcription ne sont probablement pas associées à des changements de niveaux de (p)ppGpp. Une première étape dans la mise en évidence de ce(s) mécanisme(s) consisterait à déterminer et analyser les gènes cibles de *spoT*. Pour cela, il serait intéressant d'analyser les profils de transcription des 3 souches ancestrales portant les allèles évolués de *spoT* en phase de croissance exponentielle. La comparaison de ces profils permettrait de déterminer les gènes dont l'expression est modifiée de façon parallèle suite à la présence des allèles évolués de *spoT*. Ces gènes constitueraient également de bons candidats pour expliquer le bénéfice apporté par les mutations *spoT*. Pour comprendre le(s) mécanisme(s) d'action de *spoT* sur la transcription de ses gènes cibles, une méthode pourrait consister à construire des fusions transcriptionnelles comportant un gène rapporteur tel que *lacZ* sous le contrôle de promoteurs de gènes activés ou réprimés par les mutations *spoT*. Ces fusions pourraient ensuite être introduites dans les souches ancestrales portant les mutations *spoT*, puis ces souches pourraient être soumises à une mutagenèse aléatoire. Le criblage de clones dont le niveau d'expression de ces gènes serait modifié permettrait ainsi de cibler les gènes intervenant dans ce mécanisme.

La mutation *spoT* de la population Ara-1 entraîne la modification de l'expression de nombreux gènes, ces changements n'étant pas conservés à 2000 générations et au-delà. La mutation *spoT*<sup>-1</sup> a donc des effets fortement pleiotropes (341 modifications de transcription par rapport à l'ancêtre, test de student  $p < 0,05$ ). Il est totalement improbable que la totalité des modifications observées procure un avantage dans ces conditions. L'effet bénéfique observé est probablement la somme d'effets antagonistes, neutres, néfastes et bénéfiques. Les effets augmentant le fitness de façon importante pourraient expliquer la fixation précoce des mutations *spoT* au cours de l'évolution. Les effets secondaires neutres, voire faiblement néfastes, seraient alors contre-balancés par les effets bénéfiques importants des mutations *spoT*. La suite de l'évolution expérimentale pourrait impliquer la fixation de mutations bénéfiques dans des gènes qui corrigeraient les effets néfastes des mutations *spoT*. Ce phénomène a été observé dans une autre étude d'évolution expérimentale au cours de laquelle 7 populations indépendantes ont été propagées dans un milieu minimum contenant du glycérol ou du lactate comme seule source de carbone pendant 600 à 1000 générations, à



partir d'une souche ancêtre d'*E. coli* K12 (Fong *et al.*, 2005). L'analyse du profil de transcription de ces 14 populations à divers moments de l'évolution montre que l'expression de nombreux gènes est modifiée au début de l'évolution en réponse aux nouvelles conditions de croissance. Ceci est rapidement suivi d'un retour de l'expression de la plupart des gènes au niveau ancestral (Fong *et al.*, 2005). Ainsi, un ensemble relativement restreint de gènes est exprimé différenciellement dans les clones évolués par rapport à l'ancêtre et un nombre important de changements compensatoires d'expression des gènes est observé au cours de l'évolution (Fong *et al.*, 2005). Pour tester cette hypothèse dans notre système d'évolution expérimentale, les mutations bénéfiques mises en évidence dans la population Ara-1 sont en cours d'introduction dans le contexte génétique ancestral dans leur ordre précis de fixation. Le profil de transcription des différentes souches, reflétant les étapes successives de l'histoire évolutive de cette population, sera alors analysé, permettant de déterminer les mutations impliquées dans la compensation des effets pleiotropes de la mutation *spoT*<sup>-1</sup>.

Nous avons également étudié l'impact des mutations *spoT* sur les interactions entre les protéines SpoT ancestrale et mutantes et les protéines CgtA (Wout *et al.*, 2004), jouant un rôle dans la maturation des ribosomes (Sato *et al.*, 2005), et ACP (Butland *et al.*, 2005 ; Gully *et al.*, 2003), impliquée dans le métabolisme des lipides (Majerus *et al.*, 1964). L'interaction entre SpoT et CgtA n'a pas pu être mise en évidence par une méthode de double hybride bactérien (Karimova *et al.*, 1998), ni par un test *in vitro* d'interaction entre les protéines SpoT et CgtA, et les sous-unités ribosomiques 50S, CgtA se liant à celles-ci. Nous avons pu cependant la détecter par une technique de double hybride de levure (Kolonin *et al.*, 2000). La présence des mutations *spoT* ne modifiant pas la force de l'interaction entre les protéines SpoT et CgtA, il est peu probable que cette interaction joue un rôle dans le bénéfice qu'elles apportent. L'interaction entre les protéines SpoT et ACP a été détectée par double hybride bactérien, les mutations *spoT*<sup>-1</sup> et *spoT*<sup>-4</sup> diminuant la force de cette interaction. Les résidus tyrosine 389 et lysine 662 semblent donc jouer un rôle important pour cette interaction. Il est possible que l'avantage apporté par ces mutations soit lié à ce phénotype. Dans ce cas, l'avantage dû à la mutation *spoT*<sup>+2</sup> serait apporté par un autre processus, puisqu'elle ne modifie pas la force de l'interaction entre SpoT et ACP. Cette interaction pourrait constituer un lien important entre la réponse stringente et le métabolisme des lipides, la protéine ACP jouant un rôle central dans le métabolisme des acides gras et des phospholipides. Il a été proposé que SpoT détecte la disponibilité en source de carbone via une molécule signal soluble (Gentry et Cashel, 1995), peut-être impliquée dans la biosynthèse des acides gras, déclenchant ainsi la réponse stringente. En effet, une carence en acides gras stimule

l'accumulation de (p)ppGpp via SpoT chez *E. coli* (Seyfzadeh *et al.*, 1993). Or le précurseur de biosynthèse des acides gras, l'acétyl-coA, est principalement produit lors de la glycolyse, quand le glucose est la seule source de carbone disponible (Kumari *et al.*, 2000). Ainsi une carence en glucose pourrait également causer l'inhibition de synthèse d'acides gras (DiRusso et Nyström, 1998). Selon un modèle proposé par DiRusso et Nyström, il est alors possible que SpoT détecte un signal généré pendant le métabolisme des acides gras permettant de mesurer la disponibilité en source de carbone (DiRusso et Nyström, 1998). Cette détection pourrait se faire par la protéine transporteur d'acyles ACP, qui, via une interaction avec SpoT, déclencherait alors la réponse stringente en cas de carences.

De façon globale, les mutations *spoT* présentent des effets pleiotropes subtils, parfois antagonistes (bénéfice en phase exponentielle, effet néfaste en phase stationnaire prolongée) et indépendants du niveau de (p)ppGpp. Le réseau de régulation globale que représente la réponse stringente n'est donc pas modifié de façon drastique au cours de l'évolution, mais plutôt ajusté de façon à améliorer la réponse des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale par un nouveau mécanisme dépendant de *spoT*. Les trois mutations étudiées provoquent des phénotypes similaires et semblent réduire les différences phénotypiques lors de la transition croissance-carence, en laissant les cellules dans un stade physiologique proche des conditions de croissance. L'évolution génotypique parallèle du locus *spoT* est donc à l'origine d'un parallélisme phénotypique important. Les différents phénotypes dus aux mutations *spoT* (augmentation de fitness, absence d'effet sur le niveau de (p)ppGpp, faible diminution de l'expression de *rpoS*, relâchement du contrôle stringente, modification de la transcription globale des gènes) sont majoritairement retrouvés chez les clones évolués isolés à 2000 générations des populations correspondantes. Les allèles *spoT* évolués provoquent des modifications parallèles dans les différentes populations et sont à la base du parallélisme phénotypique qui caractérise cette évolution expérimentale. Cette étude a permis de mettre en évidence des phénotypes liés au CTD de SpoT, dont la fonction est inconnue, tels que l'interaction avec la protéine ACP et des modifications globales de la transcription des gènes chez *E. coli*. L'étude de ces phénotypes devrait permettre de mettre en évidence un nouveau mécanisme SpoT-dépendant, associé à la réponse stringente.

# **Global regulatory networks plasticity during experimental evolution in *Escherichia coli*.**

Nadège Philippe,<sup>1</sup> Estelle Crozat,<sup>1</sup> Richard E. Lenski,<sup>2</sup> and Dominique Schneider<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, CNRS UMR5163, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.

\* Correspondence to: Dominique Schneider, Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, CNRS UMR5163, Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, Domaine de la Merci, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. E-mail : [dominique.schneider@ujf-grenoble.fr](mailto:dominique.schneider@ujf-grenoble.fr)

## Abbreviations

Ara<sup>-</sup>: deficiency to grow on arabinose as a carbon source.

Ara<sup>+</sup>: ability to grow on arabinose as a carbon source.

IS: Insertion Sequence.

NAD: nicotinamide adenine di-nucleotide.

PEP: phosphoenolpyruvate.

Rbs<sup>-</sup>: deficiency to grow on ribose as a carbon source.

RFLP: restriction fragment length polymorphism.

rRNA: ribosomal RNA.

TLC: thin-layer chromatography.

tRNA: transfer RNA.

## Summary

Natural selection and evolution shaped all living organisms on Earth. Strategies of experimental evolution in the laboratory, where a common ancestral cell is propagated for hundreds or thousands of generations in defined environments, provide the opportunity to analyze evolutionary processes “by eye”. The longest running evolution experiment has developed since 1988 and involves propagation of twelve evolving populations from a common ancestor of *Escherichia coli* for 40,000 generations in a constant environment. The hallmark of this evolution is adaptation through parallel phenotypic changes. Gene targets of natural selection were identified, revealing a high level of genetic parallelism. Beneficial mutations affect all levels of gene regulation in the cells: from the lower level of the gene or operon, to the higher level of global regulatory networks. In particular, two well interconnected networks have been involved in these adaptation processes: the DNA superhelicity and stringent response networks.

## Introduction

Natural selection shaped all the beautiful and extraordinary diverse phenotypes of living organisms and mutations are the raw material of these evolutionary processes.<sup>(Darwin 1859)</sup> Bacteria have evolved on Earth for billions of years, leading to both the ability to colonize any known ecological niches, and an extraordinary degree of physiological and metabolic diversity. In their natural environments, bacteria have to cope with and survive to multiple stresses and to repeated switches between conditions of nutritional feast and famine. These adaptation capabilities are usually manifest as phenotypic changes occurring in different environments. At one extreme, some bacteria develop differentiation processes, yielding cell-type diversity. Specialized bacterial cell types, occurring after asymmetric cell division, enable adaptation to starvation and harsh environments. Gram-positive bacteria can form spores, either by engulfment inside the mother cells, like *Bacillus* or *Clostridium* species<sup>(Errington 2003)</sup>, or as exospores at the end of a complex developmental program reminiscent to the biology of filamentous fungi, like *Streptomyces* species.<sup>(Flårdh 2003)</sup> After nitrogen deprivation, some cyanobacteria differentiate into heterocysts, specialized in the fixation of nitrogen.<sup>(Zhang et al. 2006)</sup> Other differentiating bacteria even evolved a socially multicellular life style, like myxobacteria constructing fruiting bodies within which they sporulate.<sup>(Kaiser 2004)</sup> At the other extreme, non-differentiating enteric bacteria, even if they divide symmetrically, undergo morphological and physiological changes when nutrients become exhausted, including cell volume decrease, cell shape modifications, nucleoid compaction, alteration in cell wall composition and in cytoplasm constituents.<sup>(Huisman et al. 1996)</sup> These phenotypic changes are associated with increased resistance to multiple stresses. Some bacterial pathogens also alternate between two phenotypically different states, an infectious non-replicating form promoting transmission to a new host and a non-infectious but metabolically-active replicative form for multiplication inside the host.<sup>(Moulder 1991; Swanson and Hammer 2000)</sup>

Although it may take different forms, transitions between favourable growth conditions and stressful environments are characterized by adaptation processes associated with various phenotypic features. These rapid and drastic environmental fluctuations are sensed by complex interconnected regulatory networks, which in turn fine-tune the global gene expression of the genome allowing an adapted response of bacteria to specific or combined stress conditions.<sup>(McAdams et al 2004)</sup> After reversal of the harsh conditions, the structural topology

of the regulatory networks, and as a consequence the global gene expression pattern, eventually returns to the initial “pre-stress” state. Genetic regulatory networks have been most intensively studied in *Escherichia coli* and are characterized by a multi-layer structure, from a local control of genes or operons, through regulation of several operons either closely localized on chromosomes (regulons) or not (stimulons), to a global control of genomic expression.<sup>(Hatfield and Benham 2002)</sup> Individual gene or operon regulation is mediated by transcription factors binding to a restricted number of DNA target sites, while regulons or stimulons are controlled by more global regulators able to bind to multiple targets. Regulatory networks are therefore organized as a power-law distribution with a small number of well-connected hub genes, encoding so-called global regulators of gene expression, and many genes with few connections.<sup>(Barabasi and Oltvai 2004)</sup> The highest level of regulation must integrate all the environmental signals and transmit them to express a required set of genes while repressing others in order to precisely adjust the global expression pattern and optimize the bacterial response to the current environmental conditions. The dynamics of the interconnected network between the global regulators is therefore the key player in bacterial adaptation and evolutionary processes. In this review, we propose that two regulatory networks, the stringent response<sup>(Cashel et al 1996)</sup> and the DNA superhelicity,<sup>(Travers and Muskhelishvili 2005)</sup> constitute these key players able to detect environmental changes and subsequently adjust the overall gene expression pattern leading to the optimal bacterial response to the external stimuli.

While the different hierarchical levels of gene expression are widely studied, the evolutionary dynamics of genetic regulatory networks is largely unknown. To understand this dynamics in bacterial adaptation processes, it is necessary to relate the topology of regulatory networks to the “fitness” feature, which is a measure of ecological success, i.e. the reproductive ability of genotypes. Characterization of the relationship between regulatory networks and improvement of organismal fitness will help to understand how natural selection is able, and at which regulatory level, to shape and improve these networks, leading to well-adapted individuals. At one extreme, one could imagine that bacteria will evolve through modifications of structural genes, leaving intact regulatory genes, while at the other extreme one could envision modifications of regulatory networks from the basal to the highest levels. The last decade has witnessed the development of experimental evolution strategies using bacteria which were propagated from a common ancestor in defined environments for several hundreds to thousands generations.<sup>(Elena and Lenski 2003)</sup> In this review, we will focus on the longest evolution experiment during which bacteria evolve under conditions of batch cultures,

therefore witnessing each day, since 1988, transitions of growth - starvation and starvation-growth.<sup>(Lenski 2004)</sup> This evolution experiment was repeated twelve times, leading to twelve evolving populations derived from a common ancestor for more than 40,000 cell generations. This experiment provides the raw material to relate phenotypic and genomic evolution over this period of time, to study how bacteria adapted to these transitions between growth and starvation, in particular if they improved structural or regulatory elements. The dynamics of regulatory networks in relation to changes in fitness can also be investigated. In this review, we will emphasize on the type of beneficial mutations that allowed bacteria to adapt to their environment and on the evolution of regulatory networks.

## **The long-term evolution experiment**

A clone of *E. coli* B was used as the common ancestor to found the longest-running evolution experiment.<sup>(LENSKI 2004)</sup> Twelve independent populations were initiated from two variants of this ancestor and propagated by daily serial transfer (a 1/100 dilution) in the same defined glucose-limited environment for more than 40,000 generations.<sup>(Lenski et al. 1991, Lenski and Travisano 1994, Cooper and Lenski 2000)</sup> The growth medium is Davis Minimal medium containing 25mM glucose (DM25). Six populations (called Ara-1 to Ara-6) were initiated from the original ancestor clone, which is unable to use arabinose as a sole carbon source (Ara-), while the six others (Ara+1 to Ara+6) were founded from an Ara+, but otherwise isogenic, revertant of the ancestor. The arabinose utilization phenotype serves as a marker in competition experiments and was shown to be neutral under these conditions.<sup>(Lenski et al 1991)</sup> At each cycle of 24 hours, the evolving cells experienced growth-starvation and starvation-growth transitions. Hence, each day cells undergo lag phase, exponential growth, stationary phase, before being transferred back into fresh medium. Under those conditions, the total size of each of the twelve populations varied between about  $5 \times 10^6$  to about  $5 \times 10^8$  cells. Mixtures of populations were sampled and frozen at regular time intervals during evolution, providing the possibility of resurrecting the frozen fossils and isolating individuals from any population and time sample. Direct comparisons can therefore be performed between any evolved individual and its progenitor in any type of environments including the one used to propagate the twelve populations. The use of *E. coli* cells for experimental evolution offers multiple advantages, as they reproduce quickly, are easy to grow, count, control and manipulate. Large populations can be obtained supplying detectable mutation diversity. Moreover, *E. coli* has also been used



as a model organism for studying its genetics, physiology, metabolic pathways, biochemistry, genomics. A huge amount of informations is therefore available together with computer analyses of regulation factors and regulatory networks.

### *Phenotypic evolution*

Fitness values were measured by directly competing evolved populations or individuals with the ancestor carrying the opposite arabinose marker in the same glucose-limited environment.<sup>(Lenski et al 1991)</sup> Fitness is calculated as the ratio of the realized (net) population growth rates obtained for the two strains while they compete with one another. All the replicate populations achieved parallel gains in competitive fitness, of about 70% after 20,000 generations, indicative of substantial adaptation.<sup>(Lenski and Travisano 1994, Cooper and Lenski 2000)</sup> The rate of fitness increase was very fast during the first 2,000 generations, and much slower afterwards, although still significant (Fig. 1A).

Several other phenotypic traits also evolved in parallel in most of the twelve populations. The most visual change corresponds to a substantial increase in cell size in all twelve populations,<sup>(Lenski and Mongold 2000)</sup> with a trajectory very similar to the one observed for evolution of fitness (Fig. 1B). The conditions to which these bacteria adapt include a succession of growth-starvation cycles, and evolved populations are characterized by shorter lag phases and higher maximum growth rates.<sup>(Vasi et al 1994)</sup>

The selection environment consists in a glucose-limiting medium and adaptation to these conditions may have generated trade-offs with decreased ability to grow in other environments, a phenomenon known as ecological specialization. Growth of the evolved populations was quantified on a wide range of substrates (64 informative substrates), revealing a significant and parallel decrease of the catabolic breadth by 42% on average after 20,000 generations.<sup>(Cooper and Lenski 2000)</sup> In one case, a complete loss of the ability to grow was observed, when ribose was used as the sole carbon source. It was suggested that this ecological specialization was mostly accounted for by the mechanism of antagonistic pleiotropy, according to which the same mutations are beneficial in the selection environment and have detrimental effects in other conditions, as opposed to the mechanism of mutation accumulation, where upon the mutations causing decreased growth abilities in other environments are neutral or even slightly deleterious in the glucose selection environment.<sup>(Cooper and Lenski 2000)</sup> This conclusion was confirmed by the discovery of beneficial mutations conferring higher fitness in the glucose environment, but lower fitness when

assayed with other sugars (see also section “Parallel changes in global gene expression: evolution of the stringent response regulatory network and of carbon utilization genes”). In particular, as stated above, we found that all twelve populations lost the ability to grow on ribose as a sole carbon source. Moreover, this parallel evolved phenotype (Rbs<sup>-</sup>) occurred very early during the experimental evolution, i.e. during the first period of fast fitness increase,<sup>(Cooper et al 2001)</sup> suggesting that loss of ribose utilization may be linked to mutations conferring increased fitness. We subsequently characterized that this evolved trait was due to deletions of the ribose-utilization genes, which are clustered within the *rbs* operon and which occurred in all twelve populations. These deletions occurred after transposition events of IS150 elements within the *rbs* operon followed by a recombination event between each of these newly arising copies and an IS150 copy present upstream of *rbs* in the ancestral genetic background.<sup>(Cooper et al 2001)</sup> These IS element activities were also responsible for a high genetic instability of the *rbs* locus, leading to a 10 times higher than expected rate of loss of the ability to use ribose as a carbon source for the ancestor strain. To check if these deletion mutations were advantageous in the selection environment, we constructed an ancestral isogenic strain except for carrying a deletion allele of the *rbs* operon, and performed competition experiments between two ancestor strains carrying either the ancestral or the deleted *rbs* allele. The mutated allele was shown to confer a 2% benefit to the cells. The combination of both the high genetic instability and the selective advantage of the mutations was able to explain the fast and parallel evolution of the Rbs<sup>-</sup> phenotype.<sup>(Cooper et al 2001)</sup>

### *Chasing mutations*

A simple calculation allows one to estimate the overall number of mutational events that may theoretically have happened in a typical population during 40,000 generations,<sup>(Lenski 2004)</sup> as the product of the effective population size (adjusted for serial dilution,  $3 \times 10^7$ ), the number of generations (40,000), the base-pair mutation rate ( $5 \times 10^{-10}$  (Drake et al 1998)) and the genome size ( $4.7 \times 10^6$  bp). The total number of mutations during 40,000 generations in each population is expected to be about  $3 \times 10^9$ . Therefore, all possible mutations at each base pair position was available to these evolving populations, without meaning that all mutations really occurred. However, based on estimations on the combined effects of natural selection and random drifts, probably fewer than 100 mutations were substituted in a typical population.<sup>(Lenski 2004)</sup> This estimate was based on the probability of substitution of a beneficial mutation and on the overall rate of neutral substitution (see<sup>(Lenski 2004)</sup> for a complete description of this estimation).

In four populations, the number of expected mutations will be higher since they developed a mutator phenotype during the course of the evolution, two around generations 2,500 to 3,000 and one around 8,500 generations,<sup>(Sniegowski et al 1997)</sup> and the last one after 15,000 generations.<sup>(Cooper and Lenski 2000)</sup> These populations revealed a 100-fold increase in mutation rates and all retained their mutator state at least through generation 20,000. Three of the populations were shown to be defective in the methyl-directed mismatch repair pathways<sup>(Sniegowski et al 1997)</sup> and mutations were subsequently detected in the *mutL* gene,<sup>(Shaver and Sniegowski 2002)</sup> whereas the underlying mutation is yet unknown in the fourth population. There is no evidence that these “mutator” mutations confer any advantage in the experimental evolution populations.<sup>(Shaver and Sniegowski 2002)</sup>

A random sequencing strategy was employed to detect point mutations in these twelve evolving populations.<sup>(Lenski et al 2003)</sup> The sequence of 36 randomly chosen genes was performed and compared between both ancestors (Ara- and Ara+) and two clones from each of two time points (10,000 and 20,000 generations) isolated from each of the 12 populations. Only exactly 10 mutations were discovered this way, and only strictly in the populations that were mutators.<sup>(Lenski et al 2003)</sup> This data set was used to estimate the ancestral mutation rate, about  $1.4 \times 10^{-10}$ . This highlights the difficulty of finding point mutations in this long-term evolution experiment even after 12 times 20,000 generations of independent evolution. Beneficial mutations, which are known to represent only a tiny fraction of all mutations,<sup>(Fisher 1930, Kimura 1983)</sup> will be even more difficult to identify and investigate. Therefore, to characterize beneficial mutations, we designed two different strategies: first, we used Insertion Sequence (IS) elements<sup>(Chandler and Mahillon 2002)</sup> as genotypic markers to follow the genetic diversity over evolutionary time. The IS elements are mobile bacterial elements carrying all genetic information required for their movement. They promote high-frequency mutational events, either through their transposition activity or as substrates for recombination events generating chromosomal rearrangements.<sup>(Schneider and Lenski 2004)</sup> They are often used as markers for species typing and for epidemiological purposes. Second, we analyzed parallel molecular phenotypes evolving in most of the 12 populations, since parallel and convergent changes in phenotypic traits are widely regarded as hallmarks of adaptive evolution.<sup>(Simpson 1953, Cunningham et al 1997)</sup> For example, parallel deletions of the *rbs* operon, which were demonstrated to be beneficial under these evolutionary conditions, were the bases of the parallel loss of the ribose utilization phenotype (see section “*Phenotypic evolution*” above).

## Genetic diversity

We analyzed the genetic diversity and genomic evolution of two of the twelve populations over the first 10,000 generations by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the seven IS elements known in *E. coli* B as molecular probes.<sup>(Papadopoulos et al 1999)</sup> Many evolved clones were isolated at several time points from the two focal populations, called Ara-1 and Ara+1, and their IS genomic fingerprints were compared to the ancestor of the experimental evolution. Construction of phylogenetic trees revealed a huge amount of diversity, almost all individuals tested in each population at 10,000 generations being different from each other (Fig. 2), and contrasting with the failure to detect any point mutation in 36 genes at 20,000 generations in all the non-mutator populations.<sup>(Lenski et al 2003)</sup> In addition to the *rbs* deletions that were detected (see section “*Phenotypic evolution*” above), five interesting IS-associated mutations were detected, which were substituted early in the populations i.e. during the period of fast fitness increase and were shared by all descendent clones. These “pivotal” mutations therefore constituted potential candidates for conferring higher fitness in these conditions. The underlying mutations were characterized by localizing the corresponding IS elements.<sup>(Schneider et al 2000)</sup> Two kinds of mutations were discovered: insertions of IS elements after transposition events and chromosomal rearrangements after recombination events between homologous IS copies (Table 1). In population Ara-1, we detected a transposition event of IS150 within the *pykF* gene, encoding pyruvate kinase I one of the two glycolytic *E. coli* pyruvate kinases catalyzing the transformation of phosphoenolpyruvate (PEP) into pyruvate,<sup>(Bledig et al 1996)</sup> potentially leading to its inactivation. In population Ara+1, four mutations were analyzed. One consists in an inversion of about one third of the chromosome through recombination between two IS150 copies, while the three others corresponded each to a transposition event of IS150. One IS150 element jumped 11 bp upstream of the *pbpA-rodA* operon, encoding penicillin-protein 2 and the morphogenic protein RodA both involved in cell wall biosynthesis and cell shape.<sup>(Begg and Donachie 1998)</sup> The two others corresponded to IS150 insertions within the coding sequence of two loci, *nadR* and *hokB-sokB*. The *nadR* gene encodes a regulatory protein involved in NAD metabolism by both repressing the NAD biosynthetic genes and influencing the transport of NAD precursors.<sup>(Penfound and Foster 1999, Grose et al 2005)</sup> The *hokB-sokB* locus is homologous to addiction modules involved in maintenance of plasmids inside bacterial host cells.<sup>(Pedersen and Gerdes 1999)</sup>

The IS transposition in each of these four genes (*pykF*, *pbpA-rodA*, *nadR*, and *hokB-sokB*) was detected in one of the two analyzed populations.<sup>(Papadopoulos et al 1999, Schneider et al 2000)</sup> We sequenced the same four genes in all the other 11 populations in evolved clones isolated after 20,000 generations.<sup>(Woods et al 2006)</sup> Mutations were substituted in both *pykF* and *nadR* in all 12 populations, and in half of them in both *pbpA-rodA* and *hokB-sokB*. This is in marked contrast with the sequencing of the 36 random genes, where no mutation was found in the 8 non-mutator populations.<sup>(Lenski et al 2003)</sup> Random genes had substitutions only in the four mutator populations, and no single gene was affected in more than one population. Parallel evolution is a hallmark of adaptation through natural selection,<sup>(Cunningham et al. 1997)</sup>, suggesting that the genetic changes in the four candidate genes may be adaptive in these conditions.

Four different statistical tests were performed using both sets of sequence data (the 36 random genes and the four candidate loci: <sup>(Woods et al 2006)</sup> i) overall substitution rates were higher for the candidate genes, ii) an excess of nonsynonymous over synonymous mutations was measured for the candidate genes, iii) a higher trend of mutations in random genes was observed in the mutator populations compared to the candidate genes, iv) the number of mutations in candidate genes follow a uniform distribution different from a Poisson distribution. These four statistical tests all revealed that natural selection drove parallel genetic changes in the four genes, and that these mutations are therefore beneficial in this experimental evolution context.

Several hypotheses can be suggested for the functional bases of the benefit that may be conferred by the different mutations.<sup>(Schneider et al. 2000, Woods et al. 2006)</sup> The *pykF* mutations may be linked to a decreased conversion of PEP to pyruvate, leading to an increase availability of PEP, which constitutes the energy source of the PTS-transport system of the only available nutrient, glucose. The *nadR* mutations may decrease NadR repressor activity and therefore increase the intracellular levels of NAD, which may be required in the evolved clones since they show increased growth rates. Inactivation of the *hokB-sokB* locus, encoding a toxin-antitoxin-like addiction module may be beneficial to the cells. The last mutations, in the regulatory region of *pbpA-rodA*, may change the levels of these two proteins which are involved in the coupling between cell wall biosynthesis and cell division. Improvement of this coupling process may be required since the 12 populations evolved larger cell size and volume (see section “*Phenotypic evolution*”).

In summary, natural selection targeted genes involved in central metabolism and cell wall biosynthesis during long-term experimental evolution in *E. coli*. Parallel genetic changes in

these genes may explain some of the parallel phenotypic modifications that occurred in these populations.

## Parallel genomic evolution

### *Parallel changes in DNA supercoiling*

The 12 populations experienced each day since 1988 cycles of growth, starvation and re-growth, conditions known to affect the DNA supercoiling level in bacterial cells.<sup>(Hatfield and Benham 2002, Reyes-Dominguez et al. 2003)</sup> We measured the DNA supercoiling state of a reporter plasmid which was introduced into three clones from each of the 12 populations at each of three time points: 2,000, 10,000, and 20,000 generations.<sup>(Croizat et al. 2005)</sup> Substantial parallel changes were detected since 10 out of the 12 populations revealed increased DNA supercoiling levels, with modifications starting before 2,000 generations in most populations and still increasing over evolutionary time. These parallel increases in the level of DNA supercoiling may therefore reflect adaptive changes, with the underlying mutations conferring enhanced fitness to the cells. The DNA supercoiling level is a precisely controlled essential process, and two types of enzymes are involved in maintaining an adequate superhelicity of the chromosome: topoisomerases,<sup>(Champoux 2001)</sup> and histone-like proteins.<sup>(Dorman and Deighan 2003)</sup> Sequencing relevant genes in the model population Ara-1, which presents two successive DNA supercoiling increases (one before 2,000 and one after 10,000 generations), revealed two mutations in the *topA* and *fis* genes.<sup>(Croizat et al. 2005)</sup> The *topA* gene encodes topoisomerase I involved in the relaxation of DNA by removing negative supercoils<sup>(Wang 1971)</sup> and also involved in the coupling process between transcription and translation by removing hypernegative supercoils behind the transcribing RNA polymerase molecules.<sup>(Drolet 2006)</sup> The *fis* gene encodes a histone-like protein, which is also a global regulator of gene expression, including ribosomal and tRNA genes, coupling the genetic and physiological states of cells to the nutritional conditions.<sup>(Mallik et al. 2004)</sup> The Fis protein adjusts DNA supercoiling by directly binding to DNA and by repressing the *gyrAB* genes encoding DNA gyrase which is the only enzyme able to introduce negative supercoils into DNA molecules.<sup>(Schneider et al. 1999)</sup> Analysis of the temporal dynamics of the appearance and substitution of both mutations revealed the fixation of the *topA* evolved allele well before 2,000 generations, whereas the *fis* evolved allele was substituted after 10,000 generations, well correlating with the two successive steps of DNA supercoiling increase observed in this focal population. A set of isogenic strains was

constructed by moving each evolved allele of *topA* and *fis*, alone and in combination, in the ancestral genetic background.<sup>(Croizat et al. 2005)</sup> Competition experiments between these ancestral strains differing only in the *topA* and/or *fis* alleles revealed that both mutations were beneficial and contributed additively to the increased DNA supercoiling, reproducing precisely the net change that was observed in the population. The *topA* evolved allele therefore was responsible for a decreased activity of the topoisomerase I, and we showed that the evolved *fis* mutation led to a decrease of the level of this global regulator. We therefore demonstrated that DNA supercoiling was an important target of selection during this evolution experiment, which suggests that global regulatory networks may have been improved to allow increased fitness. The extent of genetic parallelism in these genes is currently under investigation.

*Parallel changes in global gene expression: evolution of the stringent response regulatory network and of carbon utilization genes*

Global gene expression profiles were compared between the ancestor and two independently evolved clones sampled at 20,000 generations from populations Ara-1 and Ara+1. Several hundreds to thousands of phenotypic expression traits can be simultaneously assessed by these global expression analyses. Two different methodologies and sets of conditions were used: DNA macroarrays, with total RNAs extracted from cells sampled during exponential phase in the same medium as the one used during experimental evolution;<sup>(Cooper et al. 2003)</sup> and two-dimensional protein electrophoresis with proteins extracted from cells isolated after stationary phase in the same medium but containing a ten-time higher glucose concentration.<sup>(Pelosi et al. 2006)</sup> Whereas DNA macroarrays allows one to detect the transcription of almost all *E. coli* genes under a particular condition, a typical proteomic profile separates about 300 to 400 proteins.

Despite two different methodologies and two completely different environmental conditions (exponential versus stationary phase, two different glucose concentrations), an exceptional level of parallelism was detected in the expression profiles of both evolved clones compared to the ones obtained from the ancestor. The transcription profiles revealed parallel changes in the expression of 59 genes after 20,000 generations of experimental evolution,<sup>(Cooper et al. 2003)</sup> while 38 proteins showed quantitative parallel changes on the global protein profiles.<sup>(Pelosi et al. 2006)</sup> Remarkably, all the transcriptional and protein parallel changes evolved in the same direction compared to the ancestral expression level, reflecting their physiological and

adaptive significance. Each of these parallel changes per se is unlikely due to a particular adaptive mutation. Most of these parallel changes may rather represent a coordinated response to regulatory modifications, while some of them may be linked to more specific mutations. Since the transcriptional and protein global analyses were performed under two strikingly different environments, most genes affected by parallel changes for the two methodologies were different.<sup>(Pelosi et al. 2006)</sup> However, a close examination revealed that half of them belong to the same regulatory network, i.e. the stringent response which is involved in adaptation to nutritional stresses.<sup>(Cashel et al. 1996)</sup> The effector of the stringent response is the nucleotide guanosine tetraphosphate, called ppGpp, whose concentration increases in the cells during transition from feast to starvation conditions. Following starvation, this signal molecule reprograms the global transcription profile in the cell by inhibiting transcription of genes involved in growth (for example synthesis of stable RNAs) while activating transcription of genes necessary for survival like the amino-acid biosynthetic operons and the *rpoS* gene, encoding the stationary phase-specific sigma factor RpoS.<sup>(Hengge-Aronis 2002)</sup> Sequencing genes known to be involved in the metabolism of ppGpp revealed a mutation in the *spoT* gene, encoding a protein with both synthesis and degradation activities of ppGpp,<sup>(Gentry and Cashel 1996)</sup> in the population Ara-1. Introducing this particular mutation in the genomic context of the ancestor, and competing both ancestor clones carrying the ancestral and evolved *spoT* alleles, respectively, revealed a strong beneficial effect conferred by the *spoT* evolved allele.<sup>(Cooper et al. 2003)</sup> Therefore, bacterial adaptation occurred through improved regulatory networks and this evolutionary change caused parallel gene expression modifications, with different subsets of genes belonging to the stringent response network affected by the two growth conditions used in the transcriptomic and proteomic studies.

Despite very little strict identity in the gene targets detected by both methodologies, two parallel gene expression changes were common to the macroarrays and proteomics. Hence, decrease in the expression of the ribose operon and the maltose regulon was detected in both cases.<sup>(Pelosi et al. 2006)</sup> We already demonstrated previously the adaptive loss of the ribose consumption capacities under these experimental evolution conditions.<sup>(Cooper et al. 2001)</sup> We therefore further investigated the molecular bases of the evolved decreased ability to use maltose as a carbon source. Mutations in *malT*, the transcriptional activator of the maltose operons,<sup>(Danot 2001)</sup> were discovered in both focal Ara-1 and Ara+1 populations.<sup>(Pelosi et al. 2006)</sup> Isogenic ancestral strains were constructed by introducing each of these *malT* mutations within the chromosome of the ancestor. Competition experiments between ancestor clones



carrying the ancestral and each evolved *malT* alleles revealed that both mutations enhanced fitness in these conditions.

The *spoT* and *malT* genes were subsequently sequenced in all twelve evolving populations.<sup>(Cooper et al. 2003, Pelosi et al. 2006)</sup> Mutations were found in *spoT* in eight populations (Fig. 3), and the same situation occurred for *malT* although not in the same precise eight populations. As for the DNA superhelicity, parallel genetic changes affecting another global regulatory network, i.e. the stringent response, is one of the key evolutionary pathways in this experimental evolution. Parallel genetic changes in the stringent response regulatory network underly the parallel phenotypic changes observed in the global gene expression patterns. Likewise, at least some of the parallel catabolic decreases detected during evolution of these bacterial populations<sup>(Cooper et al. 2000)</sup> can be explained by parallel mutations in the corresponding sugar utilization operons, which are beneficial in the glucose environment. These mutations confirm that these populations evolved by ecological specialization through, at least partially, the mechanism of antagonistic pleiotropy (see section “*Phenotypic evolution*”).

Comparison of global expression profiles in independently evolving individuals highlighted adaptation through parallel genetic modifications at two levels of gene regulation: the lower level of gene regulation, i.e. the gene or operon level, and the higher level of global gene regulatory network. While mutations affecting the first level generated clear-cut phenotypes (decrease of catabolic functions), it is more difficult to predict the phenotypic consequences of substitutions affecting the second level. We therefore decided to investigate into more details the *spoT* mutations.

## **Evolutionary modifications of the stringent response regulatory network**

### *The stringent response*

The stringent response is a regulatory network allowing bacteria to cope with changing environments, in particular with different nutritional states.<sup>(Cashel et al. 1996)</sup> The effectors of this response are two nucleotide molecules, ppGpp which is derived from pppGpp by hydrolysis. Both molecules are collectively called (p)ppGpp. In response to various starvation conditions, the levels of (p)ppGpp increase intracellularly through the action of two enzymes RelA and SpoT, encoded by the *relA* and *spoT* genes. The (p)ppGpp effector is then able to reprogram the entire transcription machinery of the cell, through direct interactions with RNA

polymerase and the help of protein partners like DksA.<sup>(Magnusson et al. 2005)</sup> These overall transcription changes result in inhibition of the synthesis of stable RNAs, together with all processes involved in cell growth. At the same time, (p)ppGpp leads to a stimulation of transcription of genes necessary for survival like the amino-acid biosynthetic operons or the stress survival gene encoding RpoS, an alternative sigma factor. This coordinated response allows cells to survive under starvation conditions. After starvation, when nutrients become available, (p)ppGpp is degraded by the SpoT protein,<sup>(Gentry and Cashel 1996)</sup> allowing transcription to promote growth again.

The metabolism of (p)ppGpp is directed essentially by two proteins, RelA and SpoT. The RelA protein is a ribosome-associated (p)ppGpp synthetase involved in synthesis as a response to amino-acid starvation, the induction signal being accumulation of uncharged tRNAs.<sup>(Wendrich et al. 2002)</sup> The SpoT enzyme is a bifunctional (p)ppGpp synthetase and hydrolase, both activities being localized at the N terminal part of the protein,<sup>(Gentry and Cashel 1996)</sup> followed by a C terminal domain (CTD) of unknown function (Fig. 3), suggested to be involved in the regulation of both activities.<sup>(Mechold et al. 2002)</sup> By contrast to RelA which is specific to amino-acid starvation, SpoT is involved in (p)ppGpp regulation in response to most starvation conditions, but the SpoT-dependent signals leading to (p)ppGpp synthesis or degradation are mostly unknown.

### *Evolution of the stringent response during 20,000 generations*

Six out of the eight *spoT* mutations affected the CTD of the protein. We further investigated three of these mutations: the originally identified mutation in population Ara-1, and the two mutations substituted in populations Ara+2 and Ara-4 (Fig. 3). These three mutations affect amino-acid residues localized at the extremities and at the middle of the CTD domain of SpoT. Investigating the substitution dynamics of these three *spoT* mutations in their respective populations revealed that all three were fixed well before 2,000 generations during the period of strong fitness increase. Three isogenic ancestral strains carrying each of the *spoT* evolved alleles were constructed and compared to the ancestor bearing the ancestral *spoT* allele. Competition experiments, conducted between each of these strains and the ancestor in the same environment as the evolution experiment, confirmed the high benefit conferred by the *spoT* mutation of population Ara-1,<sup>(Cooper et al. 2003)</sup> and demonstrated that the two other mutations were also highly beneficial in these conditions with a fitness effect of about 10% (Fig. 4A). The same competition experiments were performed but samples were removed and

plated at various time points during growth and not only after 24 hours of competitions, to dissect whether the *spoT*-linked benefit was associated with the lag, exponential or stationary phases. The entire benefit conferred by all three evolved alleles was shown to be specific to growth, i.e. to exponential phase. These results highlighted the strong level of genetic and phenotypic parallelism in these evolving populations. The same increase in fitness was conferred by the three *spoT* evolved alleles in MOPS minimal medium containing 0.2% glucose, which is the medium used for measurements of (p)ppGpp levels (see next).

Using the same four strains, we carried out three types of quantitative assays of (p)ppGpp levels. After cultures of all strains in minimal MOPS medium containing 0.2% glucose as the sole carbon source and labelling with [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, nucleotides were extracted by formic acid and samples were resolved by KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> one-dimensional thin-layer chromatography (TLC).<sup>(Cashel 1994)</sup> The first assay consists in measuring accumulation of (p)ppGpp by artificially provoking the stringent response after addition of serine hydroxamate which inhibits tRNA<sup>Ser</sup> aminoacylation therefore leading to a serine starvation.<sup>(Tosa and Pizer 1971)</sup> Serine hydroxamate (0.2 mg/mL) was added to [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-labelled cultures of the four strains, and we removed samples every 5 minutes for 30 minutes. Accumulation of (p)ppGpp was followed by extracting nucleotides and resolving them on TLC plates, with mutants devoid of pppGpp and/or ppGpp as controls. Three independent experiments were performed and (p)ppGpp accumulation over starvation time was calculated as the ratio of the relative intensity of the ppGpp spots to the GTP + pppGpp + ppGpp spot intensities. The second assay consists in following (p)ppGpp degradation. Induction of (p)ppGpp accumulation was performed exactly as described with serine hydroxamate addition, followed by a reversal of the starvation by adding serine (2 mg/mL), chloramphenicol (0.1 mg/mL) and a mixture of the 20 amino-acids (0.1 mg/mL each). The reversal of starvation therefore leads to rapid degradation of (p)ppGpp through the activity of SpoT. Immediately after starvation, we sampled cells every 10 seconds during 2 minutes for each of the four strains, and the samples were treated as described previously. Three independent experiments were performed and accurate half-lives of (p)ppGpp can be calculated from straight-line slopes of decay on semi-logarithmic graphs, because the rates of decay are first-order reactions.<sup>(Cashel 1994)</sup> The third measurements consisted in sampling cells from the four strains bearing the four *spoT* alleles during growth in [ $^{32}\text{P}$ ]H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-labelled MOPS minimal medium. Samples were removed every 30 minutes during 12 hours, and subjected to the extraction procedures and to TLC. All three biochemical measurements of (p)ppGpp accumulation, degradation and levels revealed no differences whatsoever between the ancestral strains bearing the ancestral and evolved *spoT*

alleles. The high fitness increase conferred by the three mutations are therefore independent of the intracellular (p)ppGpp levels. To confirm this, we introduced the four *spoT* alleles (ancestral and three evolved) in a 606 ancestral genetic background where we previously deleted the *relA* gene. These four strains have therefore very low levels of (p)ppGpp and we competed them against the Ara<sup>+</sup> variant of the ancestor. These competition experiments confirmed a high benefit of the *spoT* evolved alleles even in this *relA*-deleted background. Therefore, the *spoT* evolved alleles conferred higher fitness independently of the (p)ppGpp levels.

Since the stringent response negatively regulates the synthesis of ribosomal RNAs upon transition into stationary phase, we determined the intracellular content of DNA, RNAs and proteins in the four previous strains (Fig. 4B). Although a stringent control is clearly observed in the four strains upon entry into starvation, the ratios of DNA, RNA and protein per cell in stationary phase relative to growth phase is higher when each of the three *spoT* evolved alleles is present, compared to the *spoT* ancestral allele (Fig. 4B). In other words, it seems that the *spoT* evolved alleles conferred a very mild relaxed phenotype in those strains. This fine-tuning leaves the strain in a “growth state” even upon entry into stationary phase. This is reminiscent to what happens in a strain devoid of (p)ppGpp,<sup>(Magnusson et al. 2003)</sup> although not to the same extent since we observed no changes in the (p)ppGpp levels. Cells containing higher levels of macromolecules in stationary phase should be at a disadvantage upon prolonged starvation. This is indeed the case, since isogenic strains bearing each of the *spoT* evolved alleles have lower fitness during competitions with the ancestral strain under prolonged starvation conditions.

## Conclusions

The hallmark of evolution of the bacterium *E. coli* during 40,000 generations in a constant environment is a very high level of parallelism, that can be characterized at various levels. At the phenotypic level, all populations revealed increased fitness associated with changes in the morphology and size of the cells. Most populations also revealed consistent changes in catabolic abilities, global gene expression patterns, and DNA supercoiling levels. Investigation of some of these parallel phenotypic changes uncovered several beneficial mutations and revealed a high level of genetic parallelism, the same genes being the targets of natural selection in most evolving populations. Despite this high genetic parallelism at the

gene level, the mutations discovered were different in the various populations. Analysis of different mutations in some target genes, like *malT* or *spoT*, however uncovered a third level of parallelism: the molecular level, the different mutations leading to similar effects. Both genetic and molecular parallelisms underly the strong parallelism observed at the phenotypic level. This is in marked contrast with sequences of randomly-chosen genes in evolved clones isolated at 20,000 generations from all twelve populations, where mutations were found only in the four mutator populations; and no single mutation was observed in more than one population.

Beneficial mutations discovered can be classified into two main categories, targeting either the lower regulation level in the cell, i.e. the gene or operon level, or the larger regulation level, i.e. the global regulator level. This reflects the overall architecture of regulatory interactions in many organisms, with many genes with one or a few connections and a small number of well-connected “hub” genes.<sup>(Barabasi and Oltvai 2004)</sup> All our data suggest that the evolutionary ability of bacterial organisms acts by plasticity of all levels of gene regulation, from a single low-connected gene whose function may be improved (or cancelled) to give a better fit to the current environment to a highly connected “hub” gene whose modification will have profound consequences onto the overall cell physiology. The first class of beneficial mutation-containing genes affect cellular functions involved in carbon source catabolism (*rbs*, *malT*), cell wall biosynthesis (*pbpA*), and metabolism (*pykF*, *nadR*). Some of them explain parallel phenotypic changes that were observed during long-term evolution. For example, repeated deletions of the *rbs* operon and mutations within *malT* are the molecular bases of the reduced ability to use ribose and maltose as carbon sources of the evolved clones. The *pbpA* mutations may be the bases of the size and morphology modifications, and mutations in *pykF* and *nadR* may explain better growth in the medium used in the evolution experiment with glucose as the sole carbon source.<sup>(Schneider et al. 2000, Woods et al. 2006)</sup>

The second class of mutations affect two global regulatory networks which are well conserved among bacteria and even in eukaryotic cells: the DNA supercoiling and the stringent response. Both networks are able to sense environmental fluctuations and induce modifications of the global gene expression pattern to respond to the external conditions.<sup>(Cashel et al. 1996, Magnusson et al. 2005, Hatfield and Benham 2002, Travers and Muskhelishvili 2005)</sup> The long-term evolution experiment provides an exquisite training ground for bacteria to adapt to transitions growth-starvation and starvation-regrowth. Adaptation occurred through changes in genes known to be global regulators under these conditions: *topA*, *fis*, and *spoT*. During growth, synthesis of stable RNAs (rRNA and tRNA) is maximal and directly related to the growth rates, whereas it

strongly decreases upon transition to stationary phase.<sup>(Bremer and Dennis 1996)</sup> Regulation of this tight control is performed mainly through (p)ppGpp which represses transcription from the rDNA promoters,<sup>(Cashel and Gallant 1969, Travers 1976)</sup> the level of DNA superhelicity which is required to be highly negative,<sup>(Lamond 1985)</sup> and the Fis histone-like protein which binds to them for activation.<sup>(Muskhelishvili et al. 1995)</sup> There is a high regulatory connection between these different levels of regulation of stable RNA synthesis, and it is therefore striking that all three revealed modifications during 40,000 generations of bacterial adaptation. The (p)ppGpp molecules were shown to destabilize the stability of the transcription initiation complexes, which is particularly drastic on stringent promoters, i.e. promoters regulated negatively by (p)ppGpp, which are already intrinsically unstable.<sup>(Zhou and Jin 1998)</sup> A crucial determinant of this negative regulation is a specific sequence, called the discriminator, which is localized between the -10 promoter box and the transcription initiation site and which is characterized by a high GC content for stringent promoters.<sup>(Travers 1980)</sup> At the same time, these stringent promoters require high negative DNA superhelicity to be optimally transcribed, since this high GC discriminator sequence provides a high energy barrier, that can be overcome by high DNA supercoiling.<sup>(Pemberton et al. 2000)</sup> During growth, DNA superhelicity is negative and high and there is no (p)ppGpp, conditions favoring transcription of rRNA. During transition into stationary phase, (p)ppGpp levels strongly and rapidly increase and the DNA is more relaxed,<sup>(Reyes-Dominguez et al. 2003)</sup> conditions inhibiting transcription of rRNA. Under starvation conditions, (p)ppGpp also have a positive effect on transcription of other genes, like the amino-acid biosynthetic operons or genes under the control of alternative sigma factors.<sup>(Magnusson et al. 2005)</sup> These positive effects have been proposed to be related to mainly two mechanisms, a passive<sup>(Barker et al. 2001)</sup> and an active<sup>(Jishage et al. 2002)</sup> model of positive regulation by (p)ppGpp. During growth, most RNA polymerase molecules are engaged in transcription of the stable rDNA operons, whereas transition into stationary phase leads to destabilization of the transcription open complexes on the stringent promoters through the action of (p)ppGpp. The passive model for activation through (p)ppGpp is therefore linked to the subsequent availability of RNA polymerase molecules to transcribe promoters for which they have much less affinity, for example the amino-acid biosynthetic operons.<sup>(Barker et al. 2001)</sup> Associated with this process, (p)ppGpp is also involved in sigma factor competition for the RNA polymerase core enzyme, by increasing the binding ability of alternative sigma factors ( $\sigma^S$ ,  $\sigma^{32}$ , and  $\sigma^{54}$ ) compared to the vegetative  $\sigma^{70}$  factor.<sup>(Jishage et al. 2002, Kvint et al. 2000, Laurie et al. 2003)</sup> Therefore, (p)ppGpp is actively involved in gene expression alterations by inducing a shift in the ability of sigma factors to recruit RNA polymerase enzyme. Collectively, the negative and

positive effects of (p)ppGpp reprograms the entire transcription machinery in the cell during the transitions between nutritional states, leading in particular to a decrease in the quantity of stable RNAs, and consequently of the total RNAs, and of ribosomes upon entry into stationary phase.

During 40,000 generations of experimental evolution of *E. coli* cells, the beneficial *spoT* mutations, although having no effect on the overall synthesis and degradation of (p)ppGpp, are responsible for a reduced decrease of the quantity of RNAs and proteins upon transition into stationary phase, compared to the ancestral strain. This is reminiscent to a relaxed phenotype, with a stringent response having a milder effect. Although the mechanism is still unknown, these *spoT* evolved alleles seem to counter-balance the effects of the (p)ppGpp effectors. This phenotypic effect may “lock” the cells into a growth state which may confer a selective advantage under these conditions where nutrients are supplied each day. Also, the beneficial increase of the DNA superhelicity level may amplify this phenomenon by facilitating transcription through the discriminator sequence of stringent promoters. Evolution of *E. coli* under these growth-starvation transition conditions therefore involved the improvement of the interplay between these two highly connected regulatory networks: the DNA superhelicity and the stringent response. Dissecting the mechanisms that allow improvement of bacterial regulatory circuits is of crucial importance to understand how natural selection shapes fitter individuals as a function of environmental conditions. The experimental evolution populations offer unique opportunities to quantify dynamics in a complex adaptive system and elucidate the interplay among these regulatory mutations. Hence, we are in the process of reconstructing and analyzing the overall evolutionary history of one model population by successively introducing the various beneficial mutations into the ancestral background.

## Acknowledgements

We thank Université Joseph Fourier and Centre National de la Recherche Scientifique for financial support. NP acknowledges the french ministry of « Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » for a research fellowship and the « Université Joseph Fourier » for an ATER funding. EC thanks the Centre National de la Recherche Scientifique for a BDI fellowship.

## References

- Barabasi A-L, Oltvai ZN. 2004. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Rev Genet* 5:101-113.
- Barker MM, Gaal T, Gourse RL. 2001. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J Mol Biol* 305:689-702.
- Begg KJ, Donachie WD. 1998. Division planes alternate in spherical cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:2564-2567.
- Bledig SA, Ramseyer TM, Saier Jr MH. 1996. FruR mediates catabolite activation of pyruvate kinase (*pykF*) gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178:280-283.
- Bremer H, Dennis PP. 1996. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. ed; *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press: Washington DC. p 1553-1569.
- Cashel M, Gallant J. 1969. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 221:838-841.
- Cashel M, Gentry VJ, Hernandez VJ, Vinella D. 1996. The stringent response. In Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. ed; *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press: Washington DC. p 1458-1496.
- Cashel M. 1994. Detection of (p)ppGpp accumulation patterns in *Escherichia coli* mutants. In Adolph KW. ed; *Methods in molecular genetics* vol 3 part A. New York NY: Academic Press. p 341-356.
- Champoux JJ. 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* 70:369-413.
- Chandler M, Mahillon J. 2002. Insertion sequences revisited. In Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM. ed; *Mobile DNA II*. Washington DC: American Society of Biology. p 305-366.
- Cooper TF, Rozen DE, Lenski RE. 2003. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1072-1077.
- Cooper VS, Lenski RE. 2000. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* 407:736-739.
- Cooper VS, Schneider D, Blot M, Lenski RE. 2001. Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli* B. *J Bacteriol* 183:2834-2841.
- Crozat E, Philippe N, Lenski RE, Geiselman J, Schneider D. 2005. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. *Genetics* 169:523-532.
- Cunningham CW, Jeng K, Husti J, Badgett M, Molineux IJ, Hillis DM, Bull JJ. 1997. Parallel molecular evolution of deletions and nonsense mutations in bacteriophage T7. *Mol Biol Evol* 14:113-116.
- Danot O. 2001. A complex signalling module governs the activity of MalT, the prototype of an emerging transactivator family. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:435-440.
- Darwin C. 1859. *On the origin of species by means of natural selection*. Murray, London.
- Dorman CJ, Deighan P. 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 13:179-184.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF. 1998. rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148:1667-1686.
- Drolet M. 2006. Growth inhibition mediated by excessive negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol Microbiol* 59:723-730.
- Elena SF, Lenski RE. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Rev Genet* 4:457-469.
- Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Rev Microbiol* 1:117-126.
- Fisher RA. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford:Oxford University Press.
- Flärdh K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* 6:564-571.
- Gentry DR, Cashel M. 1996. Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol Microbiol* 19:1373-1384.
- Grose JH, Bergthorsson U, Roth JR. 2005. Regulation of NAD synthesis by the trifunctional NadR protein of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 187:2774-2782.



- Hatfield GW, Benham CJ. 2002. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 36:175-203.
- Hengge-Aronis R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the  $\sigma^S$  (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:373-395.
- Huisman GW, Siegele DA, Zambrano MM, Kolter R. 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase. In Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE. ed; *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press: Washington DC. p 1672-1682.
- Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nyström T. 2002. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* 16:1260-1270.
- Kaiser D. 2004. Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* 58:75-98.
- Kimura M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge:Cambridge University Press.
- Kvint K, Farewell A, Nyström T. 2000. RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(S). *J Biol Chem* 275:14795-14798.
- Lamond AI. 1985. Supercoiling response of a bacterial tRNA gene. *EMBO J* 4:501-507.
- Laurie AD, Bernardo LM, Sze CC, Skarstad E, Szalewska-Palasz A, Nystrom T, Shingler V. 2003. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J Biol Chem* 278:1494-1503.
- Lenski RE, Mongold J. 2000. cell size, shape, and fitness in evolving populations of bacteria. In Brown JH, West GB. ed; *Scaling in biology*. Oxford: Oxford University Press. p 221-235.
- Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC. 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *Am Nat* 138:1315-1341.
- Lenski RE, Travisano M. 1994. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6808-6814.
- Lenski RE, Winkworth CL, Riley MA. 2003. Rates of DNA sequence evolution in experimental populations of *Escherichia coli* during 20,000 generations. *J Mol Evol* 56:498-508.
- Lenski RE. 2004. Phenotypic and genomic evolution during a 20,000-generation experiment with the bacterium *Escherichia coli*. *Plant Breed Rev* 24:225-265.
- Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 13:236-242.
- Magnusson LU, Nyström T, Farewell A. 2003. Underproduction of  $\sigma^{70}$  mimics a stringent response. *J Biol Chem* 278:968-973.
- Mallik P, Pratt TS, Beach MB, Bradley MD, Undamatla J, Osuna R. 2004. Growth-phase dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fis* P) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:122-135.
- McAdams HH, Srinivasan B, Arkin AP. 2004. The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. *Nature Rev Genet* 5:1-9.
- Mechold U, Murphy H, Brown L, Cashel M. 2002. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel<sub>Seq</sub>, the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *J Bacteriol* 184:2878-2888.
- Moulder JW. 1991. Interaction of *Chlamydiae* and host cells *in vitro*. *Microbiol Rev* 55:143-190.
- Muskhelishvili G, Travers AA, Heumann H, Kahmann R. 1995. FIS and RNA polymerase holoenzyme form a specific nucleoprotein complex at a stable RNA promoter. *EMBO J* 14:1446-1452.
- Papadopoulos D, Schneider D, Meier-Eiss J, Arber W, Lenski RE, Blot M. 1999. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3807-3812.
- Pedersen K, Gerdes K. 1999. Multiple *hok* genes on the chromosome of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 32:1090-1102.
- Pelosi L, Kühn L, Guetta D, Garin J, Geiselmann J, Lenski RE, Schneider D. 2006. Parallel changes in global protein profiles during long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. *Genetics*. In press.
- Pemberton IK, Muskhelishvili G, Travers AA, Buckle M. 2000. The GC-rich discriminator region of the *tyrT* promoter antagonises the formation of stable pre-initiation complexes. *J Mol Biol* 299:859-864.
- Penfound T, Foster JW. 1999. NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 181:648-655.

- Reyes-Dominguez Y, Contreras-ferrat G, Ramirez-Santos J, Membrillo-Hernandez J, Gomez-Eichelmann MC. 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J Bacteriol* 185:1097-1100.
- Schneider D, Duperchy E, Coursange E, Lenski RE, Blot M. 2000. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* 156:477-488.
- Schneider D, Lenski RE. 2004. Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria. *Res Microbiol* 155:319-327.
- Schneider R, Travers A, Kutateladze T, Muskhelishvili G. 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34:953-964.
- Shaver AC, Sniegowski PD. 2002. Spontaneously arising *mutL* mutators in evolving *Escherichia coli* populations are the result of changes in repeat length. *J Bacteriol* 185:6076-6082.
- Simpson GG. 1953. The major features of evolution. New York: Columbia University Press.
- Sniegowski PD, Gerrish PJ, Lenski RE. 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *Escherichia coli*. *Nature* 387:703-705.
- Stephens JC, Artz SW, Ames BN. 1975. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino-acid deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:4389-4393.
- Swanson MS, Hammer BK. 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54:567-613.
- Tosa T, Pizer LI. 1971. Biochemical basis for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *J Bacteriol* 106:972-982.
- Travers A, Muskhelishvili G. 2005. DNA supercoiling – a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nature Rev Microbiol* 3:157-169.
- Travers A. 1976. Modulation of RNA polymerase specificity by ppGpp. *Mol Gen Genet* 147:225-232.
- Travers AA. 1980. Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 141:973-976.
- Vasi F, Travisano M, Lenski RE. 1994. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. II. Changes in life-history traits during adaptation to a seasonal environment. *Am Nat* 144:432-456.
- Wang JC. 1971. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J Mol Biol* 55:523-533.
- Wendrich TW, Blaha G, Wilson DN, Marahiel MA, Nierhaus KH. 2002. Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* 10:779-788.
- Woods R, Schneider D, Winkworth C, Riley MA, Lenski RE. 2006. Tests of parallel molecular evolution in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9107-9112.
- Zhang C-C, Laurent S, Sakr S, Peng L, Bédu S. 2006. Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol Microbiol* 59:367-375.
- Zhou YN, Jin DJ. 1998. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like “stringent” RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2908-2913.

**Table 1.** IS-associated mutations that occurred during the first 2,000 Generations of experimental evolution (adapted from<sup>(Schneider et al 2000)</sup>).

<b>Mutational event</b>	<b>Gene function</b>	<b>Population *</b>
Insertion of IS150 into <i>pykF</i>	Pyruvate kinase	Ara-1 (12)
Insertion of IS150 into <i>nadR</i>	NAD** metabolism	Ara+1 (12)
Insertion of IS150 into <i>hokB-sokB</i>	Addiction module	Ara+1 (6)
Inversion between IS150 elements		Ara+1 (1)
Insertion of IS150 upstream of <i>pbpA-rodA</i> operon	Cell wall biosynthesis	Ara+1 (6)

\* The population in which the initial mutation was found by RFLP-IS is indicated, together with the number of populations (within parentheses) in which a mutation in the corresponding genes was subsequently found (see text).

\*\* Nicotinamide adenine di-nucleotide.

## Figure legend.

**Figure 1. A.** Fitness trajectory during 20,000 generations of experimental evolution with *E. coli*.<sup>(Cooper and Lenski 2000)</sup> Each dotted line represents the relative fitness values of each evolved population compared to the ancestor. The black line is the mean of the twelve populations. **B.** Cell size trajectories during 10,000 generations in each of the twelve populations.

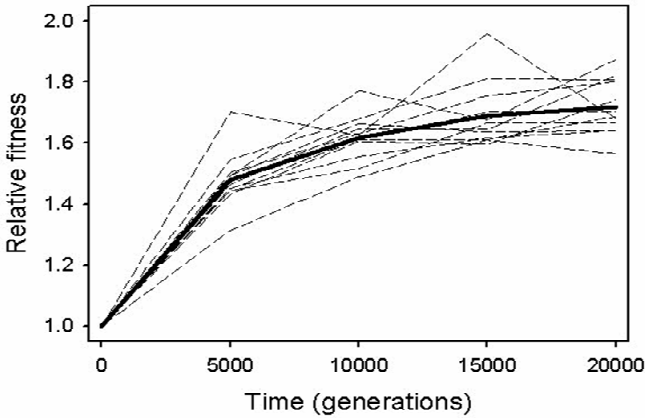
**Figure 2.** Phylogenetic trees constructed from RFLP analyses of the ancestor and evolved clones.<sup>(after Papadopoulos et al 1999)</sup> Each individual is depicted by the generation at which it was sampled followed by an arbitrary number. Inside the box are located individuals presenting the same fingerprints as the ancestor. Pivotal mutations, representing potential beneficial mutations, are shown with arrows. **A.** Population Ara+1. **B.** Population Ara-1. (Copyright 1999 National Academy of Sciences, USA).

**Figure 3.** Map of the *spoT* mutations found in eight evolving populations.<sup>(Cooper et al. 2003)</sup> The amino-acid changes are shown together with their locations within the SpoT protein. The SpoT protein is divided into three functional domains: the ppGpp hydrolase domain and the ppGpp synthetase domain,<sup>(Gentry and Cashel 1996)</sup> and the carboxy terminal domain (CTD) suggested to be involved in the regulation of the two previous domains.<sup>(Mechold et al. 2002)</sup>

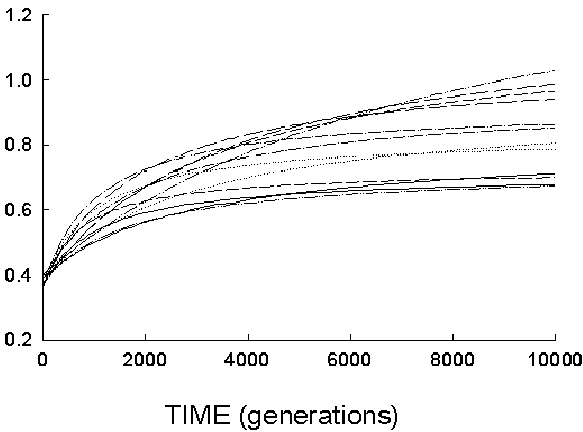
**Figure 4. A.** Fitness effects of three evolved *spoT* mutations, all moved into the ancestral genetic background. Competitions were performed in the same medium used in the long-term evolution experiment. Error bars are 95% confidence intervals based on 6 replicated competition assays for each genotype. From left to right, the four genotypes are as follows: 606 is the ancestral strain with the ancestral *spoT* allele; *spoT*<sup>-1</sup>, *spoT*<sup>+2</sup>, and *spoT*<sup>-4</sup> are alleles that evolved in populations Ara-1,<sup>(Cooper et al. 2003)</sup> Ara+2, and Ara-4, respectively, which were then moved into the ancestral chromosome. In each case, the genotype of interest competed against a variant of the 606 ancestor bearing a neutral marker, the arabinose utilization ability, that allows the distinction between both competitors. As shown previously,<sup>(Lenski et al. 1991)</sup> this marker had no discernible effect on fitness ( $H_0 = 1$ ,  $n = 12$ ,  $t_s = 0.48$ ,  $p = 0.6379$ ). All three *spoT* mutations were beneficial, with fitness relative to the ancestral *spoT* allele of 1.0935 for the Ara-1 mutation ( $H_0 = 1$ ,  $n = 6$ ,  $t_s = 10.53$ ,  $p = 0.0001$ , confirming previous data<sup>(Cooper et al. 2003)</sup>), 1.1195 for the Ara+2 mutation ( $H_0 = 1$ ,  $n = 6$ ,  $t_s = 10.52$ ,  $p = 0.0001$ ), and 1.1196 for the Ara-4 mutation ( $H_0 = 1$ ,  $n = 6$ ,  $t_s = 11.79$ ,  $p = 0.0001$ ). All these gains were eliminated when each evolved allele was replaced again by the ancestral allele, confirming that they were caused by the *spoT* mutations rather than by some hypothetical secondary mutations that might have accidentally occurred during the strain constructions. **B.** Intracellular content of cells from ancestral strains bearing the ancestral and evolved alleles of *spoT* from populations Ara-1, Ara+2, and Ara-4 (from left to right). Each strain was grown in the same medium as the evolution experiment (Davis Minimal) but containing ten times more glucose, and samples were removed in mid-exponential phase and in stationary phase after 24 hours of growth. At each time point, viable cell numbers were determined as well as the concentration of DNA, RNA and proteins (Quant-it<sup>TM</sup> high-sensitivity kits, Molecular Probes). The ratio of the concentration of each macromolecule per cell at stationary phase relative to exponential phase is shown. Error bars obtained from three independent experiments are indicated.

**Figure 1**

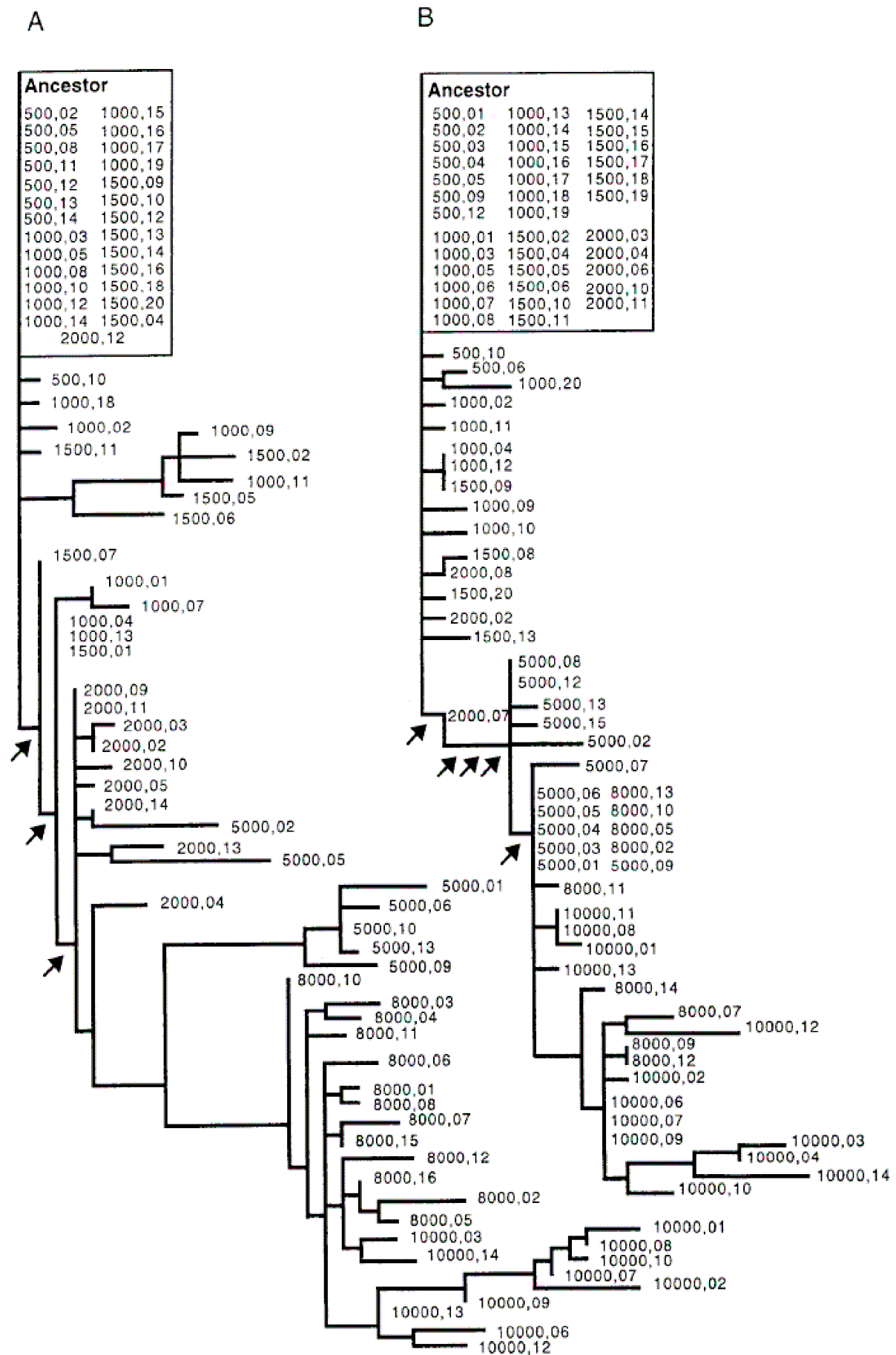
**A**



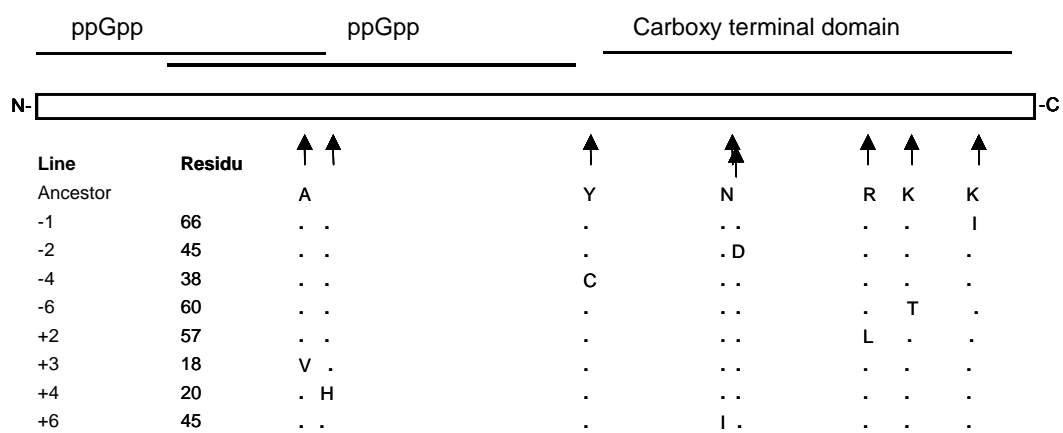
**B**



**Figure 2**



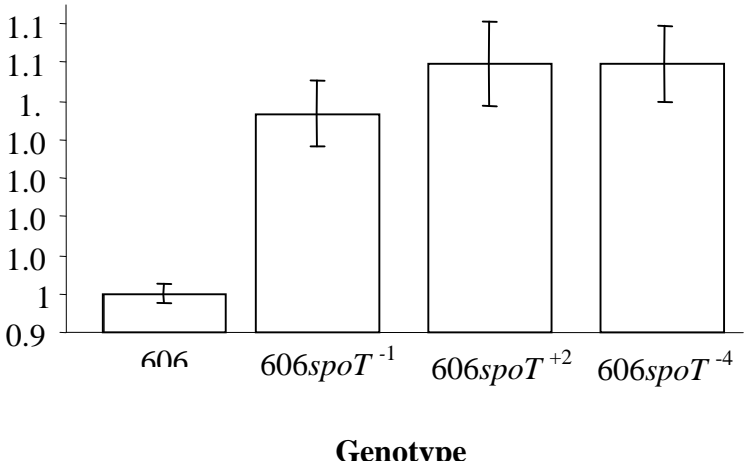
# Figure 3



**Figure 4**

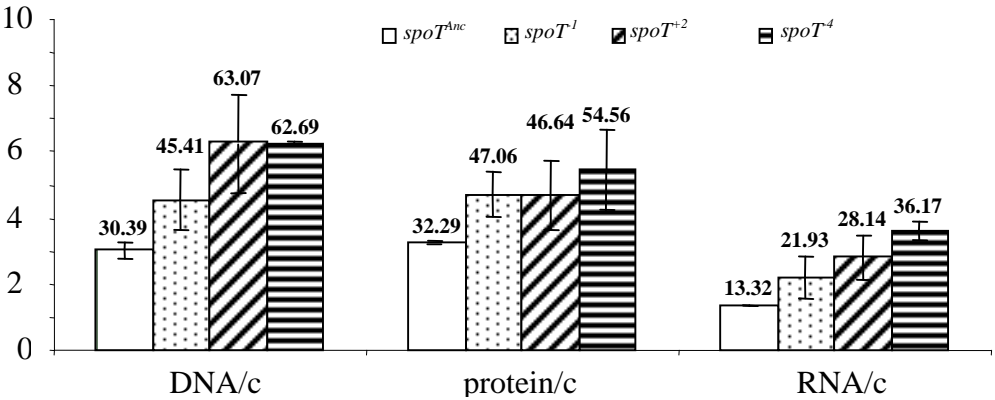
**A**

**Relative fitness**



**B**

**Ratio Stat/Expo**



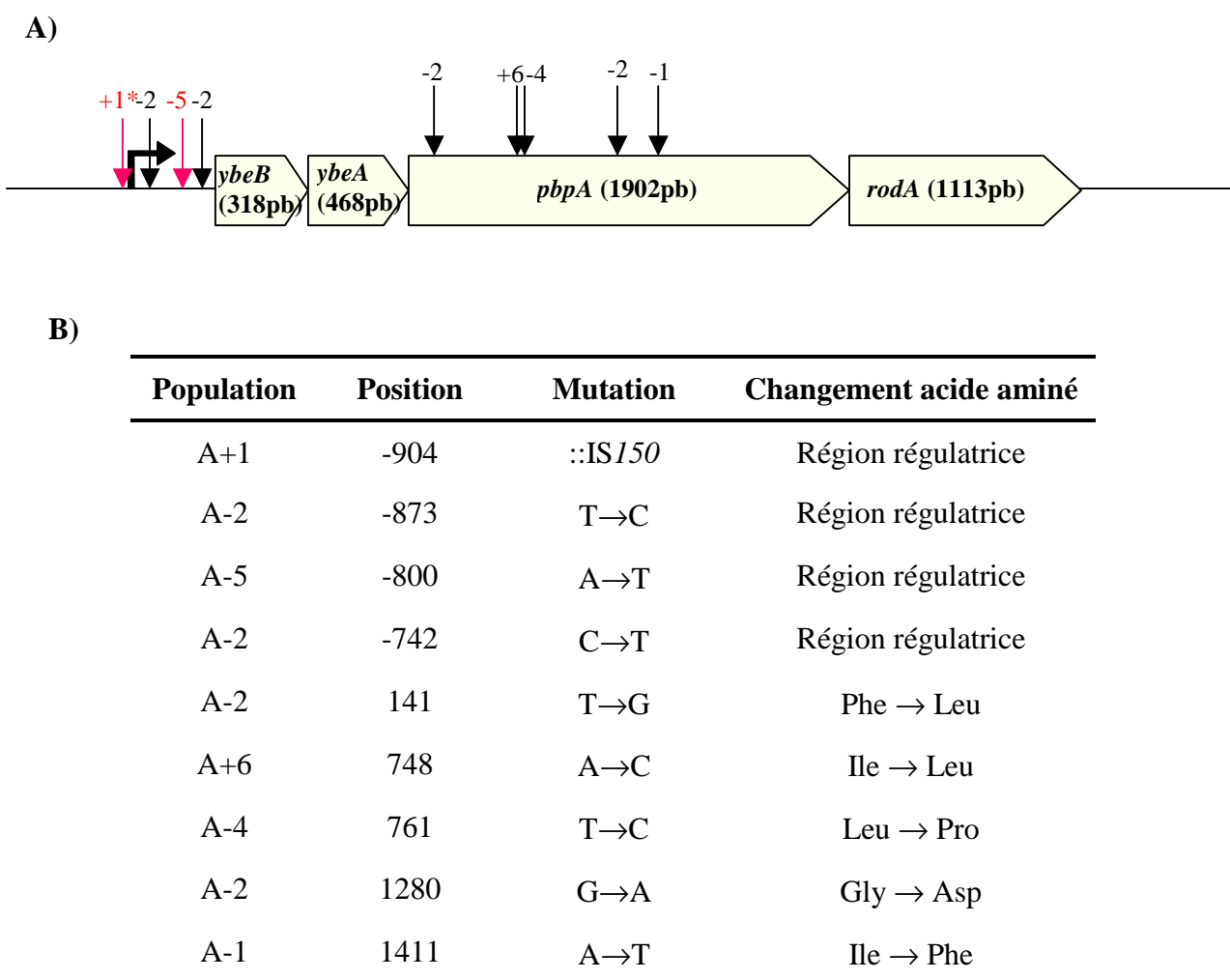


### III. Analyse de mutations du gène *pbpA* sélectionnées au cours de l'évolution

---

Lors de transitions nutritionnelles la morphologie d'*E. coli* est considérablement modifiée (voir introduction section II.1). Lors du passage des bactéries en phase stationnaire, les cellules deviennent coccoïdes et leur volume diminue. Ceci entraîne une augmentation du ratio surface/volume, ce qui favorise les échanges avec l'environnement. La stratégie d'évolution expérimentale se caractérise par des transitions journalières entre des conditions favorables à la croissance et des conditions de carence. Les clones évolués sont constitués de cellules présentant une augmentation du volume cellulaire, pouvant s'accompagner d'une morphologie de type coque (Fig.27) (Lenski et Mongold, 2000) (voir introduction section V.2.2). Ce phénotype est inattendu car il provoque une diminution du ratio surface/volume. Il est cependant observé de façon parallèle dans les 12 populations et pourrait donc être le résultat de la sélection naturelle (Lenski et Travisano, 1994).

L'analyse des éléments IS dans le génome des populations Ara+1 et Ara-1 au cours de l'évolution a permis de mettre en évidence des mutations pivotales, c'est-à-dire apparaissant de façon précoce et conservées dans la descendance (introduction section V.3) (Papadopoulos *et al.*, 1999). L'une de ces mutations correspond à la transposition d'un élément IS150 11pb en amont du promoteur de l'opéron *pbpA-rodA* dans la population Ara+1 (Fig.48) (Schneider *et al.*, 2000a). Le gène *pbpA* code la protéine PBP2 impliquée dans l'élongation du peptidoglycane en phase de croissance exponentielle (voir introduction section II.1.2) (Spratt et Pardee, 1975). Le gène *rodA* code la protéine RodA également impliquée dans la détermination de la morphologie cellulaire, mais dont la fonction exacte est inconnue. Il semblerait que la protéine PBP2 nécessite la protéine RodA pour être fonctionnelle. En effet, des mutants *rodA* présentent des phénotypes similaires aux mutants *pbpA* (Ishino *et al.*, 1986 ; Matsuzawa *et al.*, 1973 ; Tamaki *et al.*, 1980). Afin de déterminer si l'opéron *pbpA-rodA* est la cible d'autres mutations au cours de l'évolution, celui-ci a été séquencé dans les 12 populations, ce qui a permis d'identifier 8 mutations supplémentaires au sein de 5 populations (Fig.48) (Woods *et al.*, 2006). Six de ces mutations concernent les 3 populations mutatrices Ara-2, Ara-4 et Ara+6 (Shaver *et al.*, 2002). Elles sont situées aussi bien au niveau du promoteur putatif de l'opéron *pbpA-rodA* (Asoh *et al.*, 1986) que de la séquence codante du gène *pbpA* (Fig.48) (Woods *et al.*, 2006). Les deux dernières mutations



**Figure 48 : Mutations identifiées dans l'opéron *pbpA-rodA* dans les populations évoluées (d'après Woods *et al.*, 2006, Schneider *et al.*, 2000).** **A) Organisation de l'opéron *pbpA-rodA* et localisation des mutations identifiées dans les populations Ara+1, Ara+6, Ara-1, Ara-2, Ara-4 et Ara-5.** L'opéron est constitué de 4 régions codantes : *ybeA* et *ybeB* codent des protéines de fonction inconnue ; *pbpA* code la protéine PBP2 ; *rodA* code la protéine RodA. Les protéines PBP2 et RodA sont impliquées dans l'élongation de la paroi et la détermination de la morphologie cellulaire. La taille des régions codantes en pb est indiquée entre parenthèses. Les mutations identifiées dans les populations sont indiquées par des flèches, les flèches rouges désignant les mutations étudiées dans ce travail. Les numéros au-dessus des flèches représentent les populations dans lesquelles chaque mutation a été identifiée (ex : +1 = Ara+1). \* symbolise l'insertion d'un élément IS150. La flèche courbée en amont de *ybeB* représente le promoteur putatif de cet opéron (Asoh *et al.*, 1986). NB : Les populations Ara-2, Ara-4 et Ara+6 sont mutatrices. **B) Localisation et types de mutations identifiées.** La population dans laquelle chaque mutation a été identifiée est indiquée dans la colonne de gauche. La position de chaque mutation, en terme de changement de nucléotide, est donnée par rapport au premier nucléotide du codon d'initiation de la traduction du gène *pbpA*, dans la deuxième colonne. Le type de mutation est indiqué dans la 3<sup>ème</sup> colonne. Les conséquences des mutations en terme de séquence protéique sont indiquées dans la colonne de droite.

ont été identifiées au sein des populations non mutatrices Ara-5 et Ara-1 et ciblent respectivement la région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA* et la séquence codante de *pbpA* (Fig.48) (Woods *et al.*, 2006). Nous avons choisi de nous intéresser aux mutations identifiées dans les populations non mutatrices Ara-5 et Ara+1 et qui affectent la région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA*. Les conséquences phénotypiques et moléculaires de ces mutations ont été analysées par constructions et études de souches isogéniques comportant les allèles ancestral et évolués de *pbpA*.

### III.1. Matériel et méthodes

#### III.1.1. Matériel

##### III.1.1.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées au cours de ce travail sont listées dans le tableau ci-dessous.

Souches bactériennes	Description	Méthode de construction	Référence
<b>606</b>	<i>Escherichia coli</i> B Bc251, T6 <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , <i>rmIII</i> , Ara-		Lederberg, 1966
<b>607</b>	Révertant Ara+ de 606		Lenski <i>et al.</i> , 1991
<b>768</b>	Mélange de la population Ara+1 à 500 générations		Cooper et Lenski, 2000
<b>958</b>	Mélange de la population Ara+1 à 1000 générations		
<b>1062</b>	Mélange de la population Ara+1 à 1500 générations		
<b>1158</b>	Mélange de la population Ara+1 à 2000 générations		
<b>1158A</b>	Clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1 ( <i>pbpA</i> <sup>anc</sup> )		
<b>1158C</b>	Clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1 ( <i>pbpA</i> <sup>+1</sup> )		
<b>766</b>	Mélange de la population Ara-5 à 500 générations		
<b>968</b>	Mélange de la population Ara-5 à 1000 générations		
<b>1072</b>	Mélange de la population Ara-5 à 1500 générations		
<b>1168</b>	Mélange de la population Ara-5 à 2000 générations		
<b>968-8</b>	Clone évolué isolé à 1000 générations de la population Ara-5 ( <i>pbpA</i> <sup>-5</sup> )		
<b>DVS53</b>	Clone 1158C dans lequel l'allèle <i>pbpA</i> <sup>+1</sup> a été remplacé par l'allèle <i>pbpA</i> ancestral ( <i>pbpA</i> <sup>anc</sup> )	v.s.* : pDS165	Ce travail
<b>DVS79</b>	Clone 968-8 dans lequel l'allèle <i>pbpA</i> <sup>-5</sup> a été remplacé par l'allèle <i>pbpA</i> <sup>anc</sup>	v.s.* : pDS286	
<b>Lud5</b>	606 <i>pbpA</i> <sup>-5</sup>	v.s.* : pDS285	
<b>Lud6</b>	Souche Lud5 dans laquelle l'allèle <i>pbpA</i> <sup>-5</sup> a été remplacé par l'allèle <i>pbpA</i> <sup>anc</sup>	v.s.* : pDS286	

\* v.s. : souches construites grâce aux vecteurs suicide cités

### III.1.1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés au cours de ce travail sont listés dans le tableau ci-dessous.

Plasmide	Description	Amorces utilisées pour le clonage	Référence
<b>pKO3</b>	Plasmide suicide <i>sacB</i> , <i>cat</i> , Ori <i>ts</i> pSC101		Link <i>et al.</i> , (1997)
<b>pCRII-TOPO</b>	Vecteur de clonage de produits PCR, système de criblage blanc-bleu. <i>kan</i> , <i>lacZ</i> (MCS)		Invitrogen <sup>TM</sup>
<b>pDS285</b>	pKO3 portant l'allèle <i>pbpA</i> <sup>-5</sup>	ODS305-ODS306	Ce travail
<b>pDS286</b>	pKO3 portant l'allèle <i>pbpA</i> <sup>anc</sup> centré sur la position de la mutation <i>pbpA</i> <sup>-5</sup>	ODS305-ODS306	
<b>pDS165</b>	pKO3 portant l'allèle <i>pbpA</i> <sup>anc</sup> centré sur la position de la mutation <i>pbpA</i> <sup>+1</sup>	G167-G168	
<b>pRS551</b>	Vecteur utilisé pour les constructions de fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur <i>lacZ</i> . <i>amp</i> <sup>R</sup> , <i>kan</i> <sup>R</sup> , <i>lacZ</i>		Simons <i>et al.</i> , 1987
<b>pLP1</b>	pRS551 comportant la région promotrice ancestrale de <i>pbpA</i> clonée en amont du gène <i>lacZ</i>	ODS298-ODS299	Ce travail
<b>pLP2</b>	pRS551 comportant la région promotrice mutée de <i>pbpA</i> de la population Ara-5 clonée en amont du gène <i>lacZ</i>		
<b>pLP3</b>	pRS551 comportant la région promotrice mutée de <i>pbpA</i> de la population Ara+1 clonée en amont du gène <i>lacZ</i>		

### III.1.1.3. Oligonucléotides

Les amorces utilisées au cours de ce travail sont listées dans le tableau ci-dessous.

Oligonucléotide	Séquence (5'-3')
ODS298	GGG GTC GAG AAT TCA TGA CTT TTC
ODS299	GGC TGG ACG GAT CCG TAC AGA TGA
ODS305	GAC AAT GCG GTT TTT GCC TG
ODS306	GTG GAA CGC TTT ATC GCA AG
G167	ACG ACG CAG GTA CTC GGT A
G168	CTC ATG CAA GAA GAT GCC G

### III.1.1.4. Milieux de culture

#### *i. Milieux liquides*

Les milieux de culture utilisés dans ce travail sont le milieu riche LB et le milieu minimum DM supplémenté en glucose (voir section II.1.1.4.i). Le milieu TBMM est également utilisé pour la culture des souches à infecter par des bactériophages  $\lambda$  (voir section II.1.1.4.i). Les différents milieux peuvent être supplémentés en ampicilline (100 $\mu$ g/mL),

kanamycine (50µg/mL) ou chloramphénicol (30µg/mL) selon les besoins. Les dilutions de cultures bactériennes s'effectuent dans un tampon salin contenant 0,9% de NaCl.

#### *ii. Milieux solides*

Les milieux de culture solides utilisés dans ce travail sont décrits dans la section II.1.1.4.ii.

### **III.1.2. Méthodes**

#### III.1.2.1. Techniques classiques de biologie moléculaire et génétique

Les méthodes d'électrotransformation de souches bactériennes, de PCR, et de réactions enzymatiques utilisées dans ce travail sont décrites dans la section II.1.2.1.

#### III.1.2.2. Construction de mutants au moyen du plasmide-suicide pKO3

Les allèles *pbpA* ancestral et évolués des populations Ara+1 et Ara-5 ont été clonés dans le plasmide suicide pKO3 selon la méthode détaillée dans la section II.1.2.2. Les plasmides résultants (pDS285, pDS165, pDS286) ont été utilisés pour introduire l'allèle *pbpA*<sup>-5</sup> dans la souche ancêtre 606 et remplacer les allèles évolués *pbpA*<sup>+1</sup> et *pbpA*<sup>-5</sup> par l'allèle ancestral de *pbpA* dans les clones évolués 1158C et 968-8 respectivement. La méthode de remplacement d'allèle est décrite dans la section II.1.2.2. Les souches ainsi construites sont listées section III.1.1.1.

#### III.1.2.3. Détermination du fitness des bactéries : expériences de compétition

Le fitness des différentes souches est déterminé par des expériences de compétitions, dont le protocole est décrit dans la section II.1.2.3. Afin de déterminer l'effet de la mutation *pbpA*<sup>+1</sup> sur le fitness, les souches Ara+ 1158C et DVS53 ont été mises en compétition contre l'ancêtre Ara- 606 dans du milieu DM25 glucose pendant 24h. Le calcul du fitness des souches a été effectué selon la formule donnée dans la section II.1.2.3. Afin de déterminer avec précision l'effet de la mutation *pbpA*<sup>-5</sup> sur le fitness, les souches Ara- Lud5 et Lud6 ont été mises en compétition contre l'ancêtre Ara+ 607 en milieu DM25 glucose pendant 6 jours, les co-cultures étant diluées quotidiennement dans du milieu frais (1/100). Dans ce cas, le fitness a été mesuré par calcul du ratio des taux de croissance des deux

compétiteurs grâce à la formule suivante :  $\ln(N6^A/N0^A * 100^6) / \ln(N6^B/N0^B * 100^6)$  (N6 : nombre de colonies au jour 6, N0 : nombre de colonies au moment du mélange, A : compétiteur A, portant l'allèle évolué étudié, B : compétiteur B).

#### III.1.2.4. Evaluation de la résistance des souches au mécilinam

Trois cultures indépendantes des souches d'intérêt sont réalisées en milieu DM25 glucose à partir de précultures de nuit dans du milieu DM1000 glucose diluées au 1/10 000. Après 24h d'incubation, les cultures sont diluées, les dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sont étalées sur LB-agar, puis incubées pendant une nuit à 37°C. Elles sont également étalées sans dilution préalable et après dilution au 1/10 sur LB-agar contenant 3 ou 10µg/mL de mécilinam (Leo pharmaceutical products), puis incubées pendant 48h à 37°C. Les colonies sont dénombrées et la survie des différentes souches est évaluée par le rapport du nombre de colonies sur LB-mécilinam sur le nombre de colonies obtenues sur LB. La déviation standard est calculée à partir des 3 cultures indépendantes.

#### III.1.2.5. Evaluation de la résistance des souches au stress osmotique

Après une nuit d'incubation à 37°C, quatre cultures indépendantes en LB des souches d'intérêt sont diluées au 1/100 dans du LB contenant différentes concentrations de NaCl (0, 0,1, 0,2, 0,4 et 0,6 M). Après 12h d'incubation à 37°C, les différentes cultures sont diluées de façon appropriée ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  selon la concentration de NaCl), puis étalées sur LB-agar. Les colonies qui se sont développées après 24h d'incubation à 37°C sont dénombrées. La survie des différentes souches en présence de NaCl est évaluée par rapport aux cultures en LB ne contenant pas de NaCl. La déviation standard est calculée à partir des 4 cultures indépendantes.

#### III.1.2.6. Effets des mutations *pbpA* sur la morphologie cellulaire

Les souches d'intérêt sont cultivées en milieu DM250 glucose jusqu'en phase de croissance exponentielle ( $DO_{600nm} \approx 0,2$ ) à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Un échantillon de chaque culture est ensuite concentré 5 fois dans du tampon salin, afin d'obtenir une densité cellulaire suffisante, puis observé au microscope optique (Zeiss) à l'état frais.

Au cours de ce travail, la morphologie des cellules a également été analysée après incubation des cellules en présence de mécillinaam. Les souches d'intérêt ont été cultivées en milieu DM250 glucose pendant 1 heure à partir de précultures de nuit diluées au 1/100, avant ajout de 4µg/mL de mécillinaam. Cet antibiotique, de la famille des β-lactamines, inhibe spécifiquement la protéine PBP2, ce qui empêche l'élongation de la paroi de peptidoglycane durant la phase de croissance exponentielle. Les cultures ont été incubées pendant 5h supplémentaires à 37°C avant observation de la morphologie cellulaire au microscope optique, à l'état frais, après concentration des cellules de la même façon que précédemment.

### III.1.2.7. Construction des fusions transcriptionnelles *PpbpA-lacZ*

Les promoteurs ancestral et mutés de l'opéron *pbpA-rodA* sont amplifiés par PCR en utilisant les amorces ODS298, comportant un site de restriction *EcoRI*, et ODS299, comportant un site de restriction *BamHI*. Les produits PCR sont ensuite clonés dans le plasmide pCRII-TOPO (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Les inserts correspondant aux différents promoteurs de l'opéron *pbpA-rodA* sont extraits par double digestion des plasmides grâce aux enzymes *EcoRI* et *BamHI*, puis sous-clonés dans le plasmide pRS551 préalablement digéré par les mêmes enzymes. Le gène *lacZ*, porté par le plasmide pRS551 est alors sous contrôle des promoteurs de *pbpA-rodA*.

Les fusions transcriptionnelles comportant les promoteurs *PpbpA* de l'ancêtre et de la population Ara-5 clonés en amont du gène *lacZ* sont ensuite transférés *in vivo* sur l'ADN du bactériophage λRS45 (Miller *et al.*, 1977 ; Simons *et al.*, 1987). Le passage de la fusion transcriptionnelle du plasmide sur l'ADN du bactériophage λ s'effectue par double recombinaison entre des séquences homologues présentes à la fois sur l'ADN du bactériophage et du plasmide (*bla* et *lacZ*). Les bactéries contenant un des plasmides portant les fusions transcriptionnelles *PpbpA<sup>anc</sup>-lacZ* et *PpbpA<sup>-5</sup>-lacZ* sont infectées par le bactériophage λRS45. Les lysats, issus des cultures cellulaires en présence du bactériophage, sont alors récupérés. Les phages, ayant intégré les fusions transcriptionnelles, sont sélectionnés par culture sur un tapis cellulaire sur des boîtes de LB-agar contenant de la kanamycine et du X-gal. Le passage des fusions transcriptionnelles *PpbpA-lacZ* sur l'ADN du phage λ est donc visualisé par l'apparition de plages de lyse bleues et résistantes à la kanamycine (Miller *et al.*, 1977 ; Simons *et al.*, 1987). Ceci permet alors d'introduire chaque fusion transcriptionnelle en monocopie au niveau du site d'attachement du bactériophage λ de n'importe quelle souche d'intérêt, ici 606 (voir section II.1.2.5).

La mutation *pbpA* de la population Ara+1 consiste en l'insertion d'un élément *IS150* 11pb en amont de la boîte -35 du promoteur. Le génome d'*E. coli* B comportant 5 copies d'*IS150*, il serait difficile d'introduire cette mutation de façon spécifique au niveau du site d'attachement du bactériophage  $\lambda$  et en copie unique. Il serait en effet probable que la fusion transcriptionnelle s'intègre par recombinaison homologue au niveau des copies d'*IS150* chromosomiques, ce qui pourrait en outre engendrer des remaniements. Le plasmide pRS551 portant la fusion transcriptionnelle *PpbpA*<sup>+</sup>*-lacZ* est donc introduit tel quel dans la souche ancêtre 606, afin d'étudier l'activité de ce promoteur. Les plasmides pRS551 sans insert et portant la fusion *PpbpA*<sup>anc</sup>*-lacZ* sont utilisés comme contrôles.

Les mesures d'activités  $\beta$ -galactosidase sont effectuées comme indiqué dans la section II.1.2.7.

#### III.1.2.8. Préparation de protéines membranaires

Les souches d'intérêt sont cultivées une nuit dans 500mL de milieu DM250 glucose à partir de précultures de nuit diluées au 1/100. Chaque culture est ensuite centrifugée pendant 10min à 4000rpm et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est lavé par resuspension des bactéries dans 50mL de tampon Tris-HCl 70mM pH7,4. Les suspensions sont à nouveau centrifugées pendant 10min à 4000rpm et à 4°C. Les culots cellulaires sont alors resuspendus dans 20mL de tampon Tris-HCl 70mM pH7,4, puis les cellules sont lysées par deux passages successifs à la presse de French (1000psi (pound per square inch)). Les broyats cellulaires sont centrifugés pendant 10min à 4000rpm et à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires, l'ADN et les cellules entières. Le surnageant est centrifugé pendant une heure à 50 000g. Le culot correspond à la fraction membranaire des cellules. Il est resuspendu dans 250 à 500 $\mu$ L de tampon Tris-HCl 70mM pH7,4 contenant 10% (v/v) de glycérol. La suspension membranaire est aliquotée et conservée à -80°C. Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

#### III.1.2.9. Détection des PBPs par Western-blot

Quarante microgrammes de préparation membranaire dilués dans 19 $\mu$ L de tampon Tris-HCl 70mM pH7,4 sont mis en présence d'1 $\mu$ L d'ampicilline couplée à la fluorescéine 0,1mM. L'ampicilline se lie spécifiquement aux PBPs. Le mélange est incubé de 30min à 1h à 30°C. La réaction est stoppée par ajout de 5 $\mu$ L de solution dénaturante pour gel SDS-PAGE



Génération	Nombre de clones portant la mutation <i>pbpA</i> <sup>+1</sup>	Nombre de clones portant la mutation <i>pbpA</i> <sup>-5</sup>
500	0/50	0/18
1000	0/50	16/18
1500	15/50	ND
2000	44/49	18/18

**Tableau 9 : Dynamique d'invasion des mutations *pbpA* dans les populations Ara+1 et Ara-5.** Dans chaque population, le nombre d'individus évolués portant la mutation *pbpA* correspondante sur le nombre total de clones évolués analysés a été évaluée à 500, 1000, 1500 et 2000 générations. Dans le cas de la population Ara+1, ceci a été réalisé par PCR sur une cinquantaine de clones évolués isolés de cette population à différents temps de l'évolution. L'allèle évolué *pbpA*<sup>+1</sup> se caractérisant par l'insertion d'un élément *IS150* en amont du promoteur, il présente une taille de produit PCR supérieure à celle de l'allèle ancestral, ce qui permet de distinguer les deux allèles. Dans le cas de la population Ara-5, cette étude a été réalisée par PCR et restriction enzymatique sur 18 clones isolés de cette population à différents temps de l'évolution. L'allèle évolué *pbpA*<sup>-5</sup> se caractérise par une mutation ponctuelle qui élimine un site de restriction *GsuI*, ce qui permet de distinguer l'allèle *pbpA*<sup>-5</sup> de l'allèle ancestral. Le nombre de clones portant chacune des mutations est indiqué dans le tableau. ND : non déterminé.

(section II.1.2.9) et les échantillons sont incubés pendant 10min à 100°C. Les échantillons sont déposés sur gel SDS-PAGE à 8%. La migration s'effectue à raison de 15mA par gel pendant 1h30 à 2h. Les protéines sont ensuite transférées sur membranes PVDF pendant 1h30 à 100V. Les membranes sont ensuite saturées dans une solution de PBS-lait 5% pendant 2h à température ambiante, puis lavées 3 fois pendant 20min dans du tampon PBS-Tween 0,2%. Les membranes sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante dans du tampon PBS-Tween 0,2%-lait 5% contenant des anticorps anti-fluorescéine couplés à la peroxydase du radis noir dilués selon les recommandations du fournisseur (Roche). Les membranes sont ensuite lavées de la même façon que précédemment, puis révélées par la méthode d'électrochimiluminescence ECL (Amersham) selon les recommandations du fournisseur. Les compositions des différents tampons sont indiquées dans la section II.1.2.9.

Afin de repérer la protéine PBP2 sur les Western-blots, une partie des extraits membranaires est traitée au mécillinam, qui se fixe spécifiquement sur la protéine PBP2 et inhibe ainsi son marquage par l'ampicilline fluorescente. Quarante microgrammes de préparation membranaire dilués dans 17µL de tampon Tris-HCl 70mM, pH7,4 sont mis en présence de 2µL de mécillinam 0,1mM. Le mélange est incubé pendant 30min à 1h à 30°C, puis les échantillons sont marqués à l'ampicilline couplée à la fluorescéine et étudiés par Western-blot parallèlement aux échantillons non traités au mécillinam.

## **III.2. Effets des mutations de l'opéron *pbpA-rodA* sur l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale**

### **III.2.1. Dynamique d'invasion des mutations *pbpA*<sup>-5</sup> et *pbpA*<sup>+1</sup>**

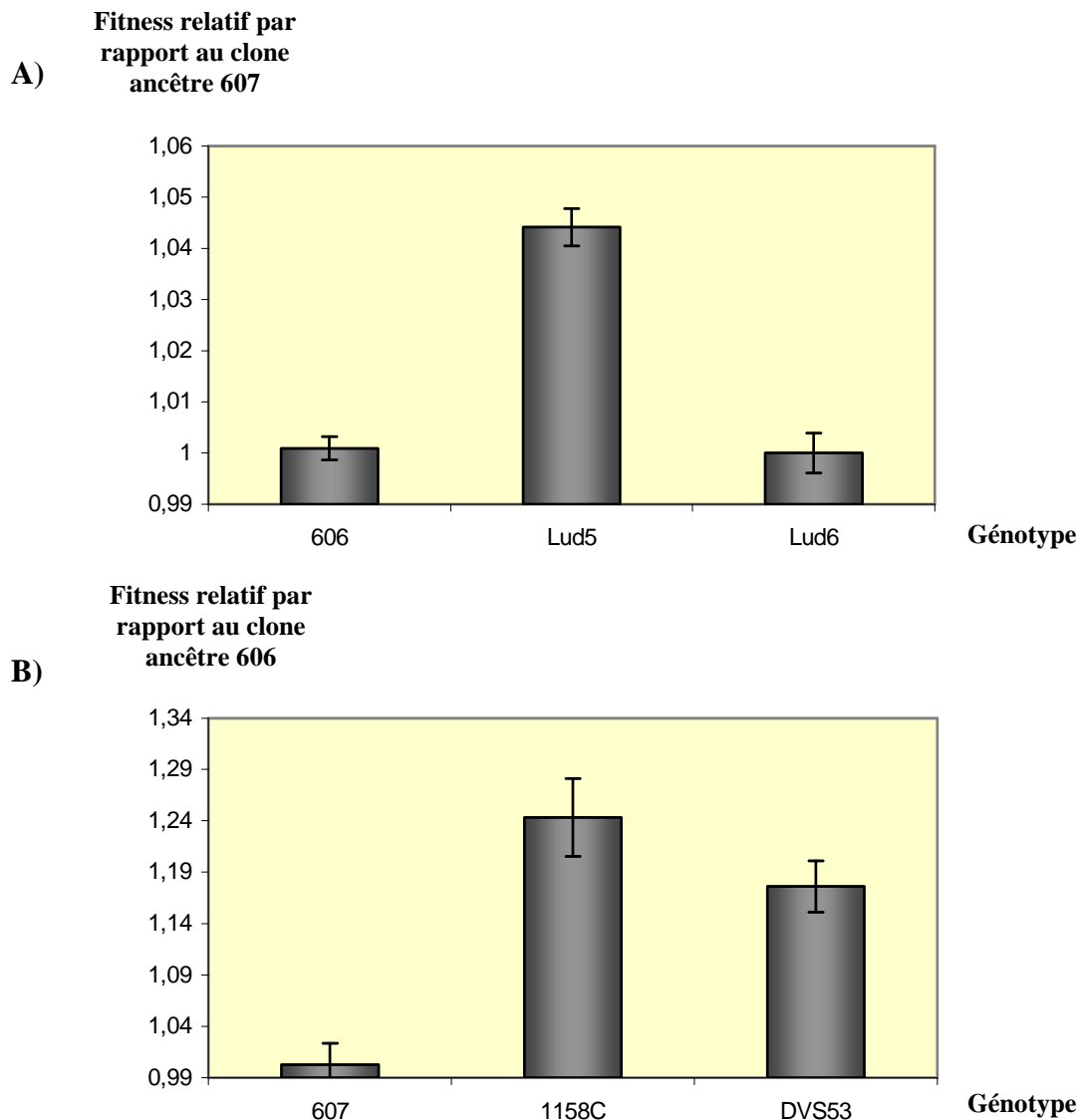
La région correspondant aux mutations a été amplifiée par PCR chez un certain nombre de clones évolués isolés à 500, 1000, 1500 et 2000 générations dans les populations Ara+1 et Ara-5 (Tableau 9). La mutation *pbpA* de la population Ara+1 correspondant à l'insertion d'un élément *IS150*, l'analyse de la taille des produits PCR suffit à distinguer les clones portant la mutation des clones portant l'allèle ancestral de *pbpA* (produits PCR obtenus avec les amorces G167 et G168 : *pbpA*<sup>anc</sup> : 987pb, *pbpA*<sup>+1</sup> : 2537pb). La mutation *pbpA* de la population Ara-5 est une mutation ponctuelle qui élimine un site de restriction *GsuI*. La présence de la mutation au sein des clones analysés est donc déterminée par PCR suivie d'une restriction enzymatique.

La mutation *pbpA* de la population Ara+1 est détectée à partir de 1500 générations chez 15 clones parmi les 50 analysés (Tableau 9). A 2000 générations, une large majorité des 49 clones étudiés portent cette mutation (44 clones). Celle-ci est donc apparue entre 1000 et 1500 générations et a envahi la population Ara+1 approximativement à 2000 générations. La mutation *pbpA* de la population Ara-5 est détectée à partir de 1000 générations chez 16 clones parmi les 18 analysés (Tableau 9). A 2000 générations, la totalité des 18 clones étudiés portent cette mutation. Celle-ci est donc apparue entre 500 et 1000 générations et a été fixée entre 1000 et 2000 générations. Ces deux mutations ont donc été fixées de façon précoce et indépendante durant la période de forte augmentation de fitness. Elles pourraient donc avoir un rôle adaptatif et apporter un bénéfice aux bactéries dans les conditions de l'évolution expérimentale. Pour tester ceci, nous avons évalué l'impact de ces mutations sur le fitness des bactéries par constructions de souches isogéniques portant les allèles ancestral et évolués de *pbpA* et mise en compétition de ces souches.

### III.2.2. Construction de souches isogéniques, excepté pour l'allèle *pbpA*

Afin d'étudier spécifiquement les phénotypes liés aux allèles évolués de *pbpA* des populations Ara-5 et Ara+1, différentes constructions ont été réalisées au moyen du plasmide suicide pKO3. L'allèle évolué de *pbpA* de la population Ara-5 a été introduit dans la souche ancêtre 606, aboutissant à la souche nommée Lud5. Cette dernière a également été « déconstruite » par réintroduction de l'allèle *pbpA*<sup>anc</sup>, conduisant à la souche Lud6. Celle-ci sert de contrôle afin de s'assurer qu'aucune mutation secondaire n'ait été fixée au cours des étapes de construction de Lud5. Ainsi, les phénotypes observés pour Lud6 doivent être similaires à ceux observés pour l'ancêtre 606. L'allèle évolué *pbpA*<sup>-5</sup> du clone 968-8 isolé à 1000 générations de la population Ara-5 a également été remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA*, générant la souche DVS79.

L'allèle évolué de *pbpA* de la population Ara+1 comporte un élément IS150. Il est donc très difficile d'introduire cet allèle évolué dans la souche ancêtre au moyen du plasmide suicide pKO3. En effet, l'allèle évolué pourrait s'intégrer par recombinaison homologue au niveau des éléments IS150, présents en 5 exemplaires chez l'ancêtre 606 (Papadopoulos *et al.*, 1999). Nous avons donc choisi de remplacer l'allèle évolué *pbpA*<sup>+1</sup> par l'allèle *pbpA*<sup>anc</sup> dans le clone évolué 1158C isolé de la population Ara+1 à 2000 générations, aboutissant à la souche nommée DVS53. Certains phénotypes ont également été analysés dans le clone évolué



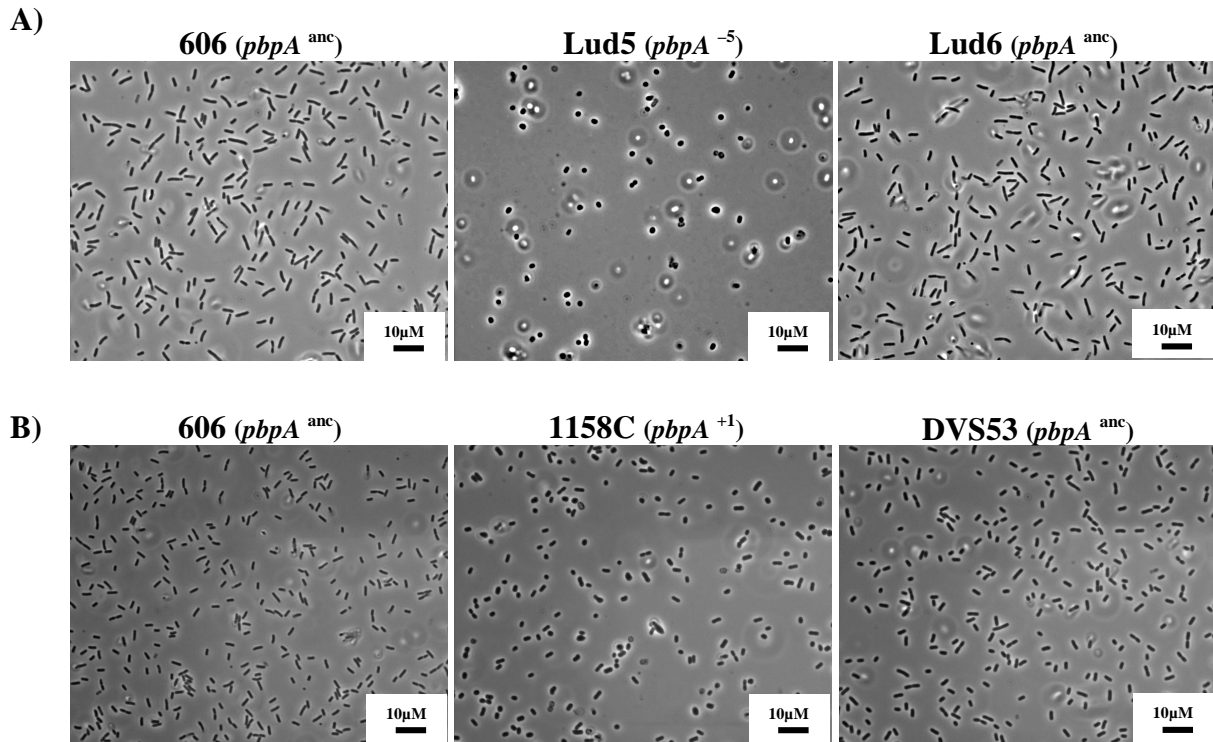
**Figure 49 : Effets des mutations *pbpA* des populations Ara-5 et Ara+1 sur le fitness des bactéries.** **A) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara-5 sur le fitness des bactéries dans le contexte génétique ancestral.** Le fitness des souches Ara- 606 (*pbpA*<sup>anc</sup>), Lud5 (606 *pbpA*<sup>-5</sup>) et Lud6 (Lud5 *pbpA*<sup>anc</sup>) a été évalué par des expériences de compétition contre la souche ancêtre Ara+ 607 (*pbpA*<sup>anc</sup>) pendant 6 jours dans le milieu de l'évolution DM25 glucose. **B) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur le fitness des bactéries dans le contexte génétique évolué.** Le fitness des souches Ara+ 607 (ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>), 1158C (clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, portant la mutation *pbpA*<sup>+1</sup>) et DVS53 (clone 1158C dans lequel l'allèle *pbpA*<sup>+1</sup> a été remplacé par l'allèle ancestral) a été évalué par des expériences de compétition contre la souche ancêtre Ara- 606 (*pbpA*<sup>anc</sup>) pendant 24h dans le milieu de l'évolution DM25 glucose. Le marqueur arabinose n'influence pas le fitness des bactéries en DM25 glucose : compétitions 606 contre 607 ( $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=0,331$ ,  $p=0,753$ ). Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% basés sur les compétitions réalisées en 6 exemplaires pour chaque génotype. La significativité des résultats a été évaluée grâce à un test statistique de Student.

1158A, également isolé de la population Ara+1 à 2000 générations, mais qui possède toujours l'allèle *pbpA*<sup>anc</sup>.

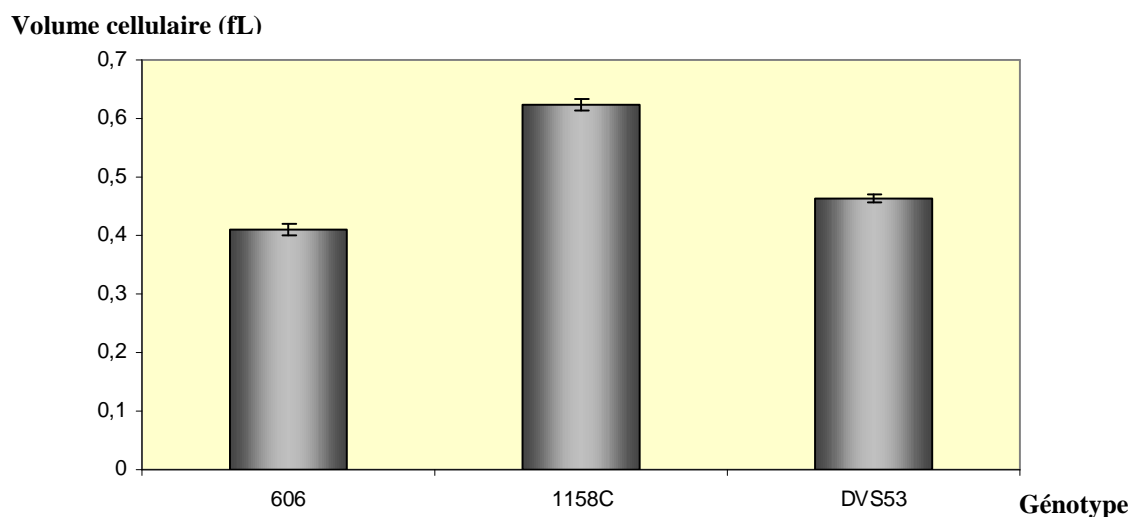
### III.2.3. Effets des mutations *pbpA* sur le fitness des bactéries

L'impact de la mutation *pbpA* de la population Ara-5 sur la capacité de reproduction des bactéries a été évalué par des expériences de compétition entre la souche Lud5 (606 *pbpA*<sup>-5</sup>) et l'ancêtre de marqueur arabinose opposé 607. Des compétitions de contrôle ont également été effectuées entre les souches Lud6 (Lud5 *pbpA*<sup>anc</sup>) et 607, ainsi qu'entre les ancêtres 606 et 607. Cela signifie que chacune des souches Lud5, Lud6 et 606 a été mise en co-culture avec la souche 607 en proportions équivalentes dans le milieu de l'évolution DM25 glucose (voir section II.1.2.3 pour plus de détails). L'effet de la mutation *pbpA*<sup>-5</sup> sur le fitness étant relativement faible, les expériences de compétitions ont été réalisées sur 6 jours consécutifs avec des dilutions au 1/100 dans du milieu frais toutes les 24h. Le fitness a été évalué par étalement des co-cultures sur TA au moment du mélange des compétiteurs et après 6 jours de compétition. La valeur de fitness a été déterminée par calcul du ratio des taux de croissance des compétiteurs. Toutes les expériences de compétition ont été réalisées 6 fois de façon indépendante. La souche Lud5 présente un fitness de 1,0441 ( $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=9,71$ ,  $p=0,0002$ ) par rapport à l'ancêtre 607 (Fig.49A). La mutation *pbpA* de la population Ara-5 procure donc un bénéfice de 4,4%. Lorsque l'allèle *pbpA*<sup>-5</sup> de Lud5 est à nouveau remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA* (Lud6), le fitness devient équivalent à celui de la souche 606 ( $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=0,0141$ ,  $p=0,9893$ ) (Fig.49A). L'avantage observé est donc bien spécifique de la mutation *pbpA*<sup>-5</sup>.

L'effet de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur le fitness des bactéries a été également évalué par des expériences de compétitions entre les souches 1158C (*pbpA*<sup>+1</sup>), DVS53 (*pbpA*<sup>anc</sup>) et l'ancêtre de marqueur arabinose opposé 606 (*pbpA*<sup>anc</sup>). Des compétitions de contrôle ont également été effectuées entre les souches ancêtres 606 et 607. Ces compétitions ont été effectuées dans le milieu de l'évolution DM25 glucose pendant 24h. Le clone évolué 1158C isolé à 2000 générations de la population Ara+1 et portant la mutation *pbpA*<sup>+1</sup> présente un fitness de 1,243 ( $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=5,085$ ,  $p=0,00011$ ) par rapport à l'ancêtre 607 (Fig.49B). Ceci est dû aux mutations bénéfiques qui se sont fixées dans cette population au cours des 2000 premières générations d'évolution, période de fort accroissement de fitness. Pour évaluer la part de la mutation *pbpA*<sup>+1</sup> dans cet accroissement de fitness, l'allèle évolué *pbpA*<sup>+1</sup> de la souche 1158C a été remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA* (DVS53). Cette



**Figure 50 : Effets des mutations *pbpA* des populations Ara-5 et Ara+1 sur la morphologie cellulaire.** Observations en microscopie optique des souches cultivées en milieu DM250 glucose jusqu'en phase exponentielle (états frais). **A) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara-5 sur la morphologie cellulaire dans le contexte génétique ancestral.** 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, Lud5 : 606 *pbpA*<sup>-5</sup>, Lud6 : souche Lud5 dans laquelle l'allèle *pbpA*<sup>-5</sup> a été remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA*. **B) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur la morphologie cellulaire dans le contexte génétique évolué.** 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158C : clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, *pbpA*<sup>+1</sup>, DVS53 : 1158C dans lequel l'allèle *pbpA*<sup>+1</sup> a été remplacé par l'allèle ancestral de *pbp*. L'échelle est donnée à l'intérieur des photographies.



**Figure 51 : Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur le volume cellulaire (Richard Lenski, communication personnelle).** Les souches 606 (*pbpA*<sup>anc</sup>), 1158C (clone évolué isolé de la population Ara+1 à 2000 générations, *pbpA*<sup>+1</sup>) et DVS53 (1158C *pbpA*<sup>anc</sup>) ont été cultivées en milieu DM25 glucose jusqu'en phase de croissance exponentielle, puis le volume des cellules a été mesuré grâce à un compteur Coulter. Ce graphique représente les valeurs moyennes de volume cellulaire mesurées sur environ 20 000 cellules ainsi que les déviations standard associées.

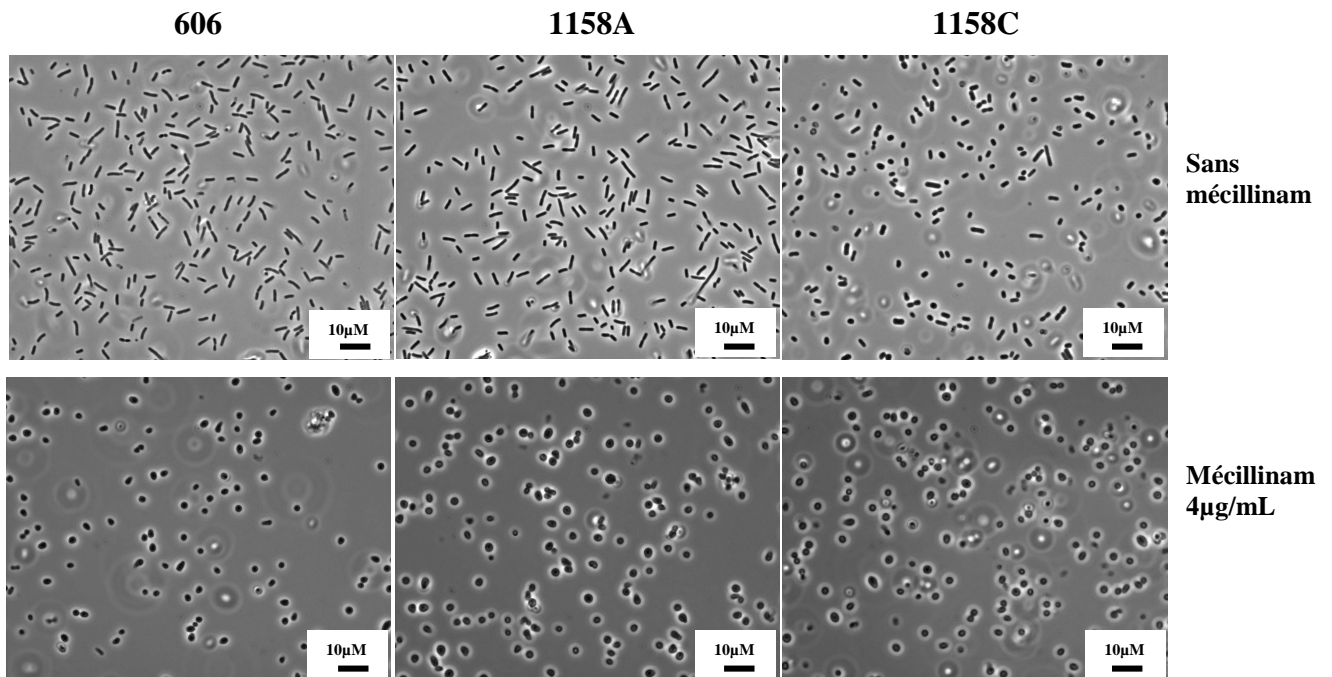
souche présente un fitness de 1,176 par rapport à l'ancêtre 607 ( $H_0=1$ ,  $n=6$ ,  $ts=18,039$ ,  $p=5,5.10^{-5}$ ), ce qui signifie que la mutation *pbpA*<sup>+1</sup> confère un avantage sélectif d'environ 7% (Fig.49B). Les mutations *pbpA*<sup>+1</sup> et *pbpA*<sup>-5</sup> sont donc bénéfiques dans les conditions de l'évolution expérimentale.

### III.3. Effets des mutations de l'opéron *pbpA-rodA* sur la morphologie cellulaire

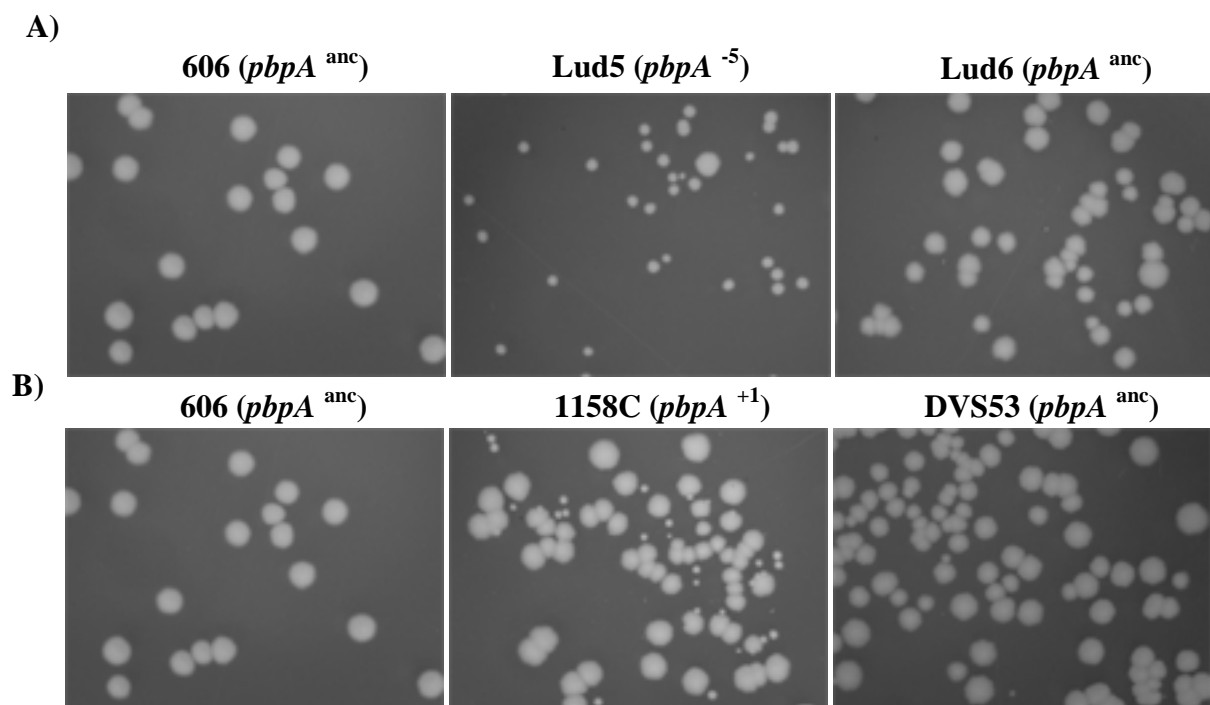
Les différentes souches ont été observées au microscope optique à l'état frais après culture en milieu DM250 glucose jusqu'en milieu de phase de croissance exponentielle. Les cellules ont été prélevées après environ 5h de culture, à une DO 600nm environ égale à 0,2 (Fig.50).

Les cellules de la souche Lud5, portant l'allèle évolué *pbpA*<sup>-5</sup>, présentent une morphologie sphérique, très différente des cellules en forme de bâtonnet de l'ancêtre 606 (Fig.50A). Lorsque l'allèle *pbpA*<sup>-5</sup> de la souche Lud5 est à nouveau remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA* (souche Lud6), les cellules retrouvent une forme de bâtonnet, caractéristique de la souche ancêtre 606 (Fig.50A). La mutation *pbpA*<sup>-5</sup> semble donc avoir un effet négatif sur l'élongation de la paroi cellulaire en phase de croissance exponentielle.

Les cellules du clone évolué 1158C présentent une morphologie cellulaire plutôt hétérogène, arrondie, avec un diamètre supérieur à celui de l'ancêtre (Fig.50B). Elles présentent également un volume cellulaire supérieur à celui de l'ancêtre (Fig.51). En effet, alors que le volume moyen d'une cellule de la souche ancêtre 606 est environ égal à 0,41fL en milieu DM25 glucose (phase exponentielle), le volume cellulaire du clone évolué 1158C est en moyenne égal à 0,62fL, soit 51,6% plus important que 606. Ce phénotype d'augmentation du volume cellulaire a été observé de façon parallèle dans les 12 populations (voir introduction section V.2.2). Lorsque l'allèle *pbpA*<sup>+1</sup> de la souche 1158C est remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA* (souche DVS53), les cellules retrouvent une forme de bâtonnet et leur diamètre diminue sans pour autant revenir au niveau ancestral (Fig.50B). Le volume cellulaire diminue également pour atteindre en moyenne 0,46fL, ce qui est légèrement supérieur à la souche 606 (Fig.51). L'allèle *pbpA*<sup>+1</sup> est donc en grande partie impliqué dans l'évolution de la morphologie cellulaire de la population Ara+1, même si d'autres mutations semblent également intervenir dans ce phénotype. Comme pour l'allèle *pbpA*<sup>-5</sup>, l'allèle évolué *pbpA*<sup>+1</sup> semble avoir un effet négatif sur l'élongation de la paroi cellulaire et le maintien du diamètre cellulaire en phase de croissance exponentielle.



**Figure 52 : Effets de l'inhibition de l'activité enzymatique de la protéine PBP2 par le mecillinam sur la morphologie cellulaire.** Observations en microscopie optique des souches cultivées en milieu DM250 glucose pendant 1h puis incubées ou non en présence de 4µg/mL de mecillinam pendant 5h (états frais). Les photographies sont à la même échelle. 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158A : clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158C : clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, *pbpA*<sup>+1</sup>.



**Figure 53 : Effets des mutations *pbpA* des populations Ara-5 et Ara+1 sur la morphologie des colonies.** Les souches ont été cultivées en milieu DM250 glucose pendant une nuit puis diluées et étalées sur LB-agar. Ces photographies représentent les colonies obtenues. **A) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara-5 sur la morphologie des colonies dans le contexte génétique ancestral.** 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, Lud5 : 606 *pbpA*<sup>-5</sup>, Lud6 : Lud5 *pbpA*<sup>anc</sup>. **B) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur la morphologie des colonies dans le contexte génétique évolué.** 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158C : clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, *pbpA*<sup>+1</sup>, DVS53 : 1158C dans lequel l'allèle *pbpA*<sup>+1</sup> a été remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA*.



La morphologie des cellules des différentes souches a également été analysée après addition de mécillinaam dans les cultures. Cet antibiotique, de la famille des  $\beta$ -lactamines, inhibe spécifiquement la protéine PBP2 (Lund et Tybring, 1972, Spratt et Pardee, 1975, Spratt, 1977). Les souches 606 (*pbpA*<sup>anc</sup>), 1158A (clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, *pbpA*<sup>anc</sup>) et 1158C (clone évolué isolé à 2000 générations de la population Ara+1, *pbpA*<sup>+1</sup>) ont été cultivées pendant une heure en milieu DM250 glucose, puis incubées pendant 5 heures supplémentaires en présence ou non de 4 $\mu$ g/mL de mécillinaam. La morphologie cellulaire a ensuite été analysée par microscopie optique (Fig.52). En absence de mécillinaam, les effets morphologiques des différents allèles de *pbpA* ont été retrouvés. En effet, les cellules portant l'allèle ancestral de *pbpA* (606 et 1158A) présentent une morphologie de type bâtonnet, alors que celles de la souche 1158C portant l'allèle évolué *pbpA*<sup>+1</sup> présentent une morphologie cellulaire hétérogène avec une proportion élevée de cellules sphériques (Figs.50B et 52). Lorsque ces trois souches sont cultivées en présence de mécillinaam, l'élongation de la paroi par la protéine PBP2 est inhibée, ce qui conduit à des cellules sphériques plus volumineuses (Fig.52), confirmant les résultats obtenus au cours d'études antérieures (James *et al.*, 1975, Matsuhashi *et al.*, 1974). La morphologie observée pour les cellules des souches 1158C et Lud5, possédant les allèles évolués *pbpA*<sup>+1</sup> et *pbpA*<sup>-5</sup>, tend ainsi à se rapprocher de celle observée en présence de mécillinaam. Ceci pourrait suggérer une diminution de la quantité de PBP2 provoquée par la présence des allèles évolués de *pbpA*.

L'effet des mutations sur l'aspect des colonies a également été analysé. Les différentes souches ont été cultivées en milieu DM250 glucose jusqu'en phase de croissance exponentielle, puis diluées et étalées sur LB-agar. Les boîtes ont été incubées pendant une nuit à 37°C et la morphologie des colonies a été observée (Fig.53). Les souches Lud5 et 1158C, portant respectivement les allèles évolués de *pbpA* des populations Ara-5 et Ara+1, présentent des colonies de taille hétérogène (Fig.53). La substitution des allèles évolués par l'allèle ancestral de *pbpA* restaure une homogénéité de taille des colonies dans les souches Lud6 et DVS53 (Fig.53). Le clone évolué 1158A, isolé à 2000 générations de la population Ara+1, portant l'allèle ancestral de *pbpA*, présente également des colonies homogènes.

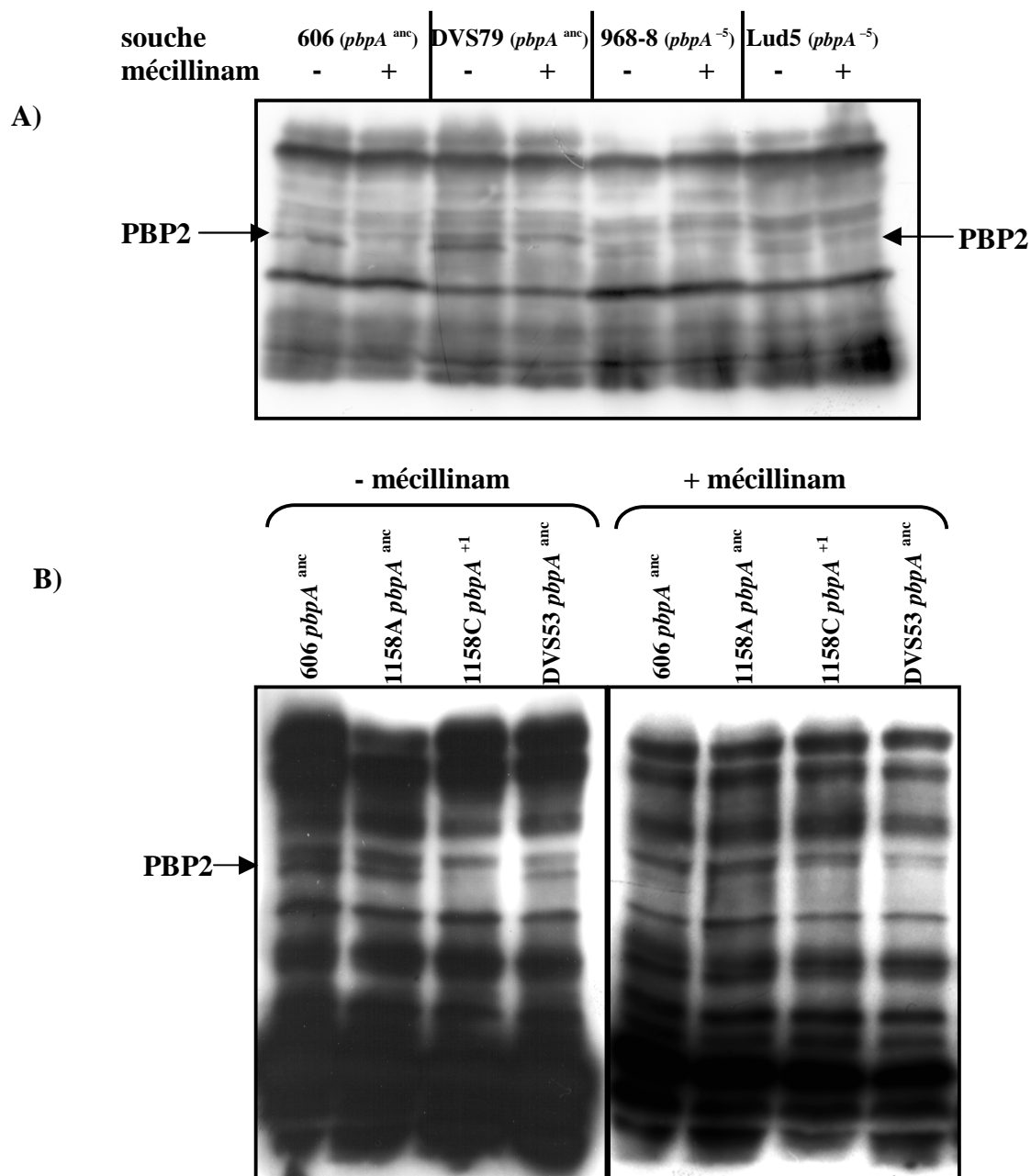
	Promoteur fusionné à <i>lacZ</i>	Activité $\beta$ -galactosidase en phase exponentielle (DO 600nm = 0,2)	Activité $\beta$ -galactosidase en phase stationnaire (24h)
A)	<i>PpbpA</i> <sup>anc</sup>	100	100
	<i>PpbpA</i> <sup>-5</sup>	7,35 +/- 0,67	12,87 +/- 0,58
B)	<i>PpbpA</i> <sup>anc</sup>	100	100
	<i>PpbpA</i> <sup>+1</sup>	45 +/- 4	51 +/- 5

**Tableau 10 : Effets des mutations *pbpA* identifiées dans les populations Ara-5 et Ara+1 sur l'activité du promoteur de l'opéron *pbpA-rodA*.** Activités spécifiques  $\beta$ -galactosidase de fusions transcriptionnelles comportant les promoteurs ancestral et évolués de l'opéron *pbpA-rodA* fusionnés au gène rapporteur *lacZ* dans le contexte génétique ancestral. Ces activités ont été mesurées en phase exponentielle (DO 600nm = 0,2) et au bout de 24h de culture en milieu DM250 glucose. Les activités  $\beta$ -galactosidase associées aux promoteurs mutants sont exprimées par rapport au promoteur de l'opéron *pbpA* de l'ancêtre, dont l'activité est toujours fixée arbitrairement à 100 (nmol substrat utilisé / sec /  $\mu$ g de protéines). La déviation standard est calculée pour chaque expérience réalisée à partir de 3 cultures indépendantes. **A) Activité du promoteur *PpbpA*<sup>-5</sup> par rapport au promoteur *PpbpA*<sup>anc</sup>.** Les fusions transcriptionnelles ont été introduites dans le chromosome de la souche ancêtre 606 au site d'attachement du bactériophage  $\lambda$ . **B) Activité du promoteur *PpbpA*<sup>+1</sup> par rapport au promoteur *PpbpA*<sup>anc</sup>.** Les fusions transcriptionnelles, portées par le plasmide pRS551, ont été introduites dans la souche ancêtre 606. L'activité résiduelle du plasmide pRS551 ne comportant pas d'insert a également été mesurée et déduite des activités  $\beta$ -galactosidase mesurées pour les promoteurs *PpbpA*<sup>anc</sup> et *PpbpA*<sup>+1</sup>.

### III.4. Effets des mutations de l'opéron *pbpA-rodA* sur l'expression de *pbpA*

Deux types d'analyses ont été réalisées. D'une part, la transcription de l'opéron *pbpA-rodA* a été mesurée par la construction de fusions transcriptionnelles entre les promoteurs ancestral et évolués de *pbpA-rodA* et le gène *lacZ*. D'autre part, le niveau de la protéine PBP2 dans les différentes souches portant les allèles ancestral et évolués de *pbpA-rodA* a été mesuré par détection des protéines PBPs (Western-blot).

Les deux mutations *pbpA*<sup>+1</sup> et *pbpA*<sup>-5</sup> sont situées au niveau de la région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA*. Des fusions transcriptionnelles comportant les régions promotrices ancestrale et évoluées de l'opéron *pbpA-rodA* clonées en amont du gène rapporteur *lacZ* ont été construites. Les différentes régions promotrices ont été amplifiées par PCR et clonées dans le site de clonage multiple du plasmide pRS551 en amont du gène *lacZ* (Simons *et al.*, 1987). Les fusions transcriptionnelles comportant la région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA* de l'ancêtre et de la population Ara-5 ont ensuite été transférées sur l'ADN du bactériophage  $\lambda$ RS45, qui comporte le gène de résistance à la kanamycine. Ce transfert s'effectue *in vivo* par double recombinaison homologue entre les gènes *bla* et *lacZ* présents à la fois sur le plasmide et le génome du bactériophage (Miller *et al.*, 1977 ; Simons *et al.*, 1987). Les particules phagiques ayant intégré la fusion transcriptionnelle génèrent des plages de lyse bleues sur un milieu contenant du X-gal et de la kanamycine. Celles-ci permettent de constituer un stock de bactériophage  $\lambda$  portant les fusions transcriptionnelles. L'infection d'une souche bactérienne avec cette souche bactériophagique permet d'introduire la fusion transcriptionnelle en copie unique au niveau du site d'attachement du bactériophage  $\lambda$ . De cette façon, les fusions transcriptionnelles *PpbpA*<sup>-5</sup>-*lacZ* et *PpbpA*<sup>anc</sup>-*lacZ* ont été introduites sur le chromosome de la souche ancêtre 606. La fusion transcriptionnelle comportant la région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA* de la population Ara+1 n'a quant à elle pas été introduite sur le chromosome de la souche 606. En effet, la mutation *pbpA*<sup>+1</sup> consiste en l'insertion d'un élément *IS150* 11pb en amont de la boîte -35 du promoteur de l'opéron *pbpA-rodA*. Le génome d'*E. coli* comportant plusieurs copies d'*IS150*, il serait probable que la fusion transcriptionnelle s'intègre par recombinaison homologue au niveau des copies chromosomiques d'*IS150*. Il serait donc difficile d'introduire cette mutation de façon spécifique au niveau du site d'attachement du bactériophage  $\lambda$  et en copie unique. Le plasmide pRS551 portant la fusion transcriptionnelle *PpbpA*<sup>+1</sup>-*lacZ* a donc été introduit tel quel dans la souche ancêtre 606, afin d'étudier l'activité de ce promoteur. Les plasmides pRS551 sans insert et portant la fusion *PpbpA*<sup>anc</sup>-*lacZ* ont été utilisés comme témoins.



**Figure 54 : Effets des mutations *pbpA* des populations Ara-5 et Ara+1 sur l'expression de la protéine PBP2.** Les protéines membranaires des souches cultivées en milieu DM1000 glucose jusqu'en phase stationnaire (8h) ont été extraites selon le protocole détaillé section III.1.2.8. Pistes sans mécollinam (-) : les extraits obtenus ont été traités à l'ampicilline fluorescente qui se lie aux PBPs. Des Westerns-blots ont été réalisés sur 40µg de ces échantillons grâce à un anticorps anti-fluorescéine permettant de visualiser les PBPs qui ont fixé l'ampicilline. Pistes avec mécollinam (+) : les mêmes échantillons ont été traités au préalable avec du mécollinam qui se lie spécifiquement à la protéine PBP2 et empêche alors la fixation de l'ampicilline fluorescente. La protéine PBP2 n'apparaît donc pas sur ces pistes. Ceci permet de visualiser la protéine PBP2 par comparaison avec les échantillons non traités au mécollinam. **A) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara-5 sur l'expression de la protéine PBP2.** 606 : *pbpA<sup>anc</sup>*, 968-8 : clone évolué isolé à 1000 générations dans la population Ara-5, *pbpA<sup>-5</sup>*, DVS79 : 968-8 *pbpA<sup>anc</sup>*, Lud5 : 606 *pbpA<sup>-5</sup>*. **B) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur l'expression de la protéine PBP2.** 606 : *pbpA<sup>anc</sup>*, 1158A : clone évolué isolé à 2000 générations dans la population Ara+1, *pbpA<sup>anc</sup>*, 1158C : clone évolué isolé à 2000 générations dans la population Ara+1, *pbpA<sup>+1</sup>*, DVS53 : 1158C *pbpA<sup>anc</sup>*.

Les activités des régions promotrices ancestrale et évoluées de l'opéron *pbpA-rodA* ont été évaluées par mesures de l'activité  $\beta$ -galactosidase de la souche 606 portant chacune des fusions transcriptionnelles (Tableau 10). Ces mesures ont été effectuées sur chaque souche cultivée en milieu DM250 glucose jusqu'en phase de croissance exponentielle (DO 600nm = 0,2) et en phase stationnaire après 24h d'incubation à 37°C. L'activité des régions promotrices évoluées de l'opéron *pbpA-rodA* est exprimée par rapport à l'activité du promoteur ancestral (Tableau 10). La région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA* de la population Ara-5 présente une activité 13 fois moins importante que la région promotrice ancestrale en phase de croissance exponentielle et 8 fois moins importante en phase stationnaire (Tableau 10). La région promotrice de l'opéron *pbpA-rodA* de la population Ara+1 présente une activité 2 fois moins importante que la région promotrice ancestrale quelle que soit la phase de croissance. Les mutations *pbpA*<sup>+1</sup> et *pbpA*<sup>-5</sup> altèrent donc fortement l'activité du promoteur de l'opéron *pbpA-rodA*. En revanche, il est difficile de comparer quantitativement l'effet de ces deux mutations l'une par rapport à l'autre, les deux méthodes de mesures étant différentes.

L'expression de la protéine PBP2 a été étudiée par détection des protéines PBPs chez les souches 606, Lud5, 968-8, DVS79, 1158A, 1158C et DVS53 cultivées en milieu DM1000 glucose jusqu'en phase stationnaire (8h). Quarante microgrammes des fractions membranaires de chaque souche ont été incubés en présence de 5 $\mu$ M d'ampicilline couplée à la fluorescéine, afin de marquer les PBPs auxquelles l'ampicilline se lie. Après migration sur gel SDS-PAGE 8%, les différents échantillons ont été transférés sur membranes PVDF, puis incubés en présence d'anticorps anti-fluorescéine couplés à la peroxydase du radis noir. Les protéines PBPs ont été révélées par la méthode d'électrochimiluminescence (ECL). Afin de repérer la bande correspondant à la protéine PBP2, 40 $\mu$ g des mêmes échantillons membranaires ont été préalablement incubés en présence de 10 $\mu$ M de mécillinam avant marquage à l'ampicilline couplée à la fluorescéine. Le mécillinam se fixe spécifiquement à la protéine PBP2, au niveau du même site que l'ampicilline, ce qui empêche son marquage par l'ampicilline fluorescente. La protéine PBP2 n'apparaît donc pas sur les Western-blots pour ces échantillons traités au mécillinam. La comparaison des Western-blots réalisés sur les échantillons incubés ou non en présence de mécillinam permet donc de repérer spécifiquement la protéine PBP2.

La comparaison des échantillons, traités ou non au mécillinam, provenant de la souche ancêtre 606 permet la détection de la bande protéique correspondant à la protéine PBP2 (Fig.54). Cette bande est présente dans toutes les souches et disparaît systématiquement

lorsque les échantillons sont traités avec du mécillina. Il s'agit également de la seule bande disparaissant suite à ce traitement, ce qui suggère fortement qu'elle correspond bien à la protéine PBP2. Malgré sa présence dans toutes les souches, la quantité de PBP2 semble diminuer dans les souches 968-8 (clone évolué isolé à 1000 générations de la population Ara-5, *pbpA*<sup>-5</sup>) et Lud5 (606 *pbpA*<sup>-5</sup>) (Fig.54A). Lorsque l'allèle évolué *pbpA*<sup>-5</sup> est remplacé par l'allèle ancestral de *pbpA* dans la souche 968-8 (souche DVS79), l'intensité de la bande correspondant à PBP2 augmente nettement (Fig.54A). La mutation *pbpA*<sup>-5</sup> provoque donc une diminution de la quantité de la protéine PBP2, confirmant les résultats obtenus grâce aux fusions transcriptionnelles. Cette baisse du niveau de PBP2 est donc due à une diminution de la transcription de l'opéron *pbpA-rodA*.

De la même façon, le clone évolué 1158C, isolé de la population Ara+1 à 1000 générations et portant l'allèle *pbpA*<sup>+1</sup>, présente une nette diminution de la quantité de la protéine PBP2 par rapport à l'ancêtre 606 (Fig.53B). Ceci n'est pas le cas dans le clone évolué 1158A, également isolé de la population Ara+1 à 1000 générations et portant l'allèle ancestral de *pbpA* (Fig.53B). Lorsque l'allèle *pbpA*<sup>+1</sup> du clone 1158C est remplacé par l'allèle ancestral (souche DVS53), l'expression de la protéine PBP2 augmente (Fig.53B). La mutation *pbpA*<sup>+1</sup> provoque donc une diminution de l'expression de la protéine PBP2, ce qui confirme également les résultats obtenus pour les fusions transcriptionnelles.

### **III.5. Effets des mutations de l'opéron *pbpA-rodA* sur la résistance des bactéries au mécillina**

Lorsque l'activité transpeptidase de la protéine PBP2 est inhibée par le mécillina, les bactéries deviennent sphériques (Fig.52) et perdent leur aptitude à former des colonies (James *et al.*, 1975 ; Matsushashi *et al.*, 1974). A terme, l'inhibition de la protéine PBP2 provoque la lyse cellulaire (Signoretto *et al.*, 2002 ; Aono *et al.*, 1979 ; Ogura *et al.*, 1989). L'influence de la diminution de l'expression de PBP2 due aux mutations *pbpA*<sup>-5</sup> et *pbpA*<sup>+1</sup> sur la sensibilité des bactéries au mécillina a été déterminée. Trois cultures indépendantes des souches d'intérêt ont été réalisées en milieu DM25 glucose à partir de précultures de nuit dans du milieu DM1000 glucose diluées au 1/10 000. Après 24h d'incubation, les cultures ont été diluées et étalées sur LB-agar contenant ou non 10µg/mL de mécillina. La fréquence des mutants résistants au mécillina de chacune des souches a été évaluée par rapport aux étalements sur LB-agar ne contenant pas d'antibiotique. La fréquence de mutants résistants au mécillina de la souche ancêtre 606 est inférieure à  $4,5 \cdot 10^{-6}$  (Tableau

Fréquence de mutants résistants au mécillinam	
<b>606</b>	$<4,5.10^{-6}$
<b>Lud5</b>	$1,51.10^{-5} \pm 7,4.10^{-6}$
<b>Lud6</b>	$9,98.10^{-7} \pm 1,41.10^{-6}$
<b>968-8</b>	$3,35.10^{-5} \pm 1,86.10^{-6}$
<b>DVS79</b>	$<3.10^{-6}$
<b>1158A</b>	$4,86.10^{-6} \pm 2,75.10^{-6}$
<b>1158C</b>	$6,63.10^{-5} \pm 5,86.10^{-6}$
<b>DVS53</b>	$1,20.10^{-6} \pm 1,7.10^{-6}$

**Tableau 11 : Effets des mutations *pbpA* identifiées dans les populations Ara-5 et Ara+1 sur la résistance des bactéries au mécollinam.** Les différentes souches ont été cultivées en DM25 glucose pendant 24h puis diluées et étalées sur LB-agar contenant ou non 10µg/mL de mécollinam. La fréquence d'apparition de mutants résistants au mécollinam a été évaluée pour chaque souche par le rapport du nombre de colonies sur LB-agar contenant du mécollinam sur le nombre de colonies apparues sur LB-agar. La déviation standard a été calculée pour chaque expérience réalisée à partir de 3 cultures indépendantes. 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, Lud5 : 606 *pbpA*<sup>-5</sup>, Lud6 : Lud5 *pbpA*<sup>anc</sup>, 968-8 : clone évolué isolé à 1000 générations dans la population Ara-5, *pbpA*<sup>-5</sup>, DVS79 : 968-8 *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158A : clone évolué isolé à 2000 générations dans la population Ara+1, *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158C : clone évolué isolé à 2000 générations dans la population Ara+1, *pbpA*<sup>+1</sup>, DVS53 : 1158C *pbpA*<sup>anc</sup>.

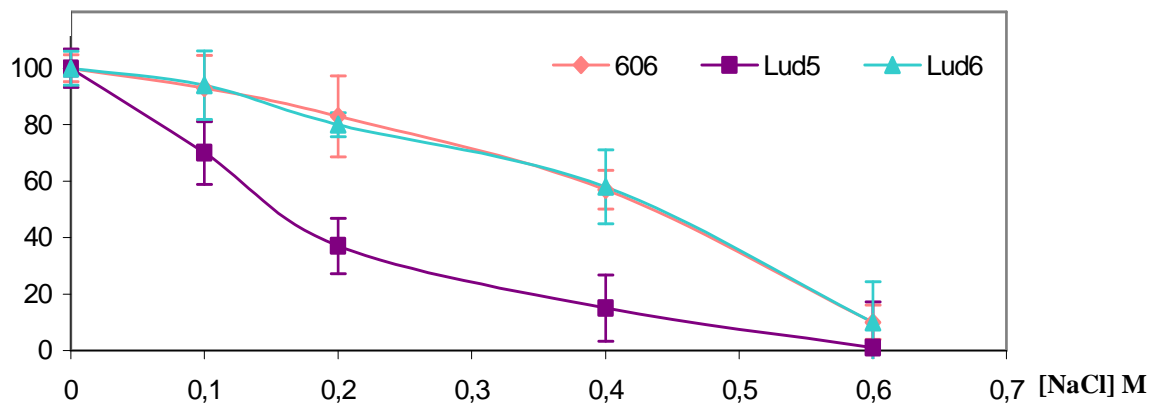
11), ce qui est conforme aux valeurs obtenues par Vinella *et al.* (1996) ( $7.10^{-6}$ ). La même expérience a été réalisée avec  $3\mu\text{g/mL}$  de mécillinaam, et une fréquence de mutants résistants au mécillinaam égale à  $3,1.10^{-5}$  a été obtenue pour la souche ancêtre 606, ce qui est une fois de plus conforme aux résultats obtenus par Vinella *et al.* (1996) en présence de  $1\mu\text{g/mL}$  de mécillinaam ( $5.10^{-5}$ ). Une augmentation du niveau de résistance au mécillinaam est observée chez les souches portant les allèles évolués de *pbpA*. La souche Lud5 ( $606\text{ }pbpA^{-5}$ ) présente une fréquence de mutants résistants égale à  $1,51.10^{-5}$ , soit au moins 3 fois plus importante que la souche 606 (Tableau 11). La souche 968-8 (clone évolué isolé à 1000 générations de la population Ara-5,  $pbpA^{-5}$ ) présente une fréquence de mutants résistants égale à  $3,36.10^{-5}$ , soit au moins 7 fois plus importante que la souche 606 (Tableau 11). Enfin, la souche 1158C portant l'allèle  $pbpA^{+1}$  présente une fréquence de mutants résistants égale à  $6,63.10^{-5}$ , soit au moins 14 fois plus importante que la souche 606 (Tableau 11). Lorsque les allèles évolués de *pbpA* sont remplacés par l'allèle ancestral de *pbpA* (Lud6, DVS79, DVS53), la fréquence de mutants résistants au mécillinaam redevient similaire à la souche ancêtre 606 (Tableau 11). De la même façon, le clone évolué 1158A isolé à 2000 générations de la population Ara+1 et portant l'allèle ancestral de *pbpA* présente une fréquence de mutants résistants semblable à la souche ancêtre 606 ( $4,8.10^{-6}$ ) (Tableau 11).

### III.6. Effets des mutations de l'opéron *pbpA-rodA* sur la résistance des bactéries au stress osmotique

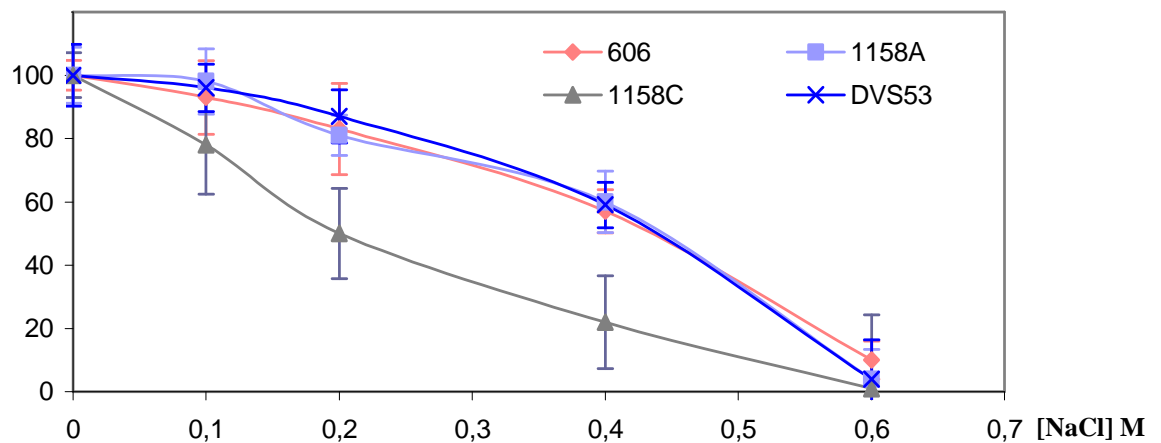
Le peptidoglycane joue un rôle très important de protection des cellules contre la pression osmotique. Les mutations  $pbpA^{-5}$  et  $pbpA^{+1}$  diminuant le niveau d'expression de PBP2 et entraînant une morphologie cellulaire de type coque, il est possible qu'elles affectent la résistance des cellules au stress osmotique. Les souches 606, Lud5, Lud6, 1158A, 1158C et DVS53 ont été cultivées en milieu LB en présence de différentes concentrations de NaCl. Après une préculture d'une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$ , les cultures ont été diluées au 1/100 dans du milieu LB contenant différentes concentrations de NaCl (0, 0,1, 0,2, 0,4 et 0,6 M). Toutes les cultures ont été réalisées 4 fois de façon indépendante. Après 12h d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , les différentes cultures ont été diluées puis étalées sur LB-agar. La survie des différentes souches en présence de NaCl a été évaluée par rapport aux étalements des cultures en LB ne contenant pas de NaCl (Fig.55). La souche Lud5 portant l'allèle  $pbpA^{-5}$  présente une sensibilité accrue au stress osmotique par rapport aux souches 606 et Lud6 portant l'allèle ancestral de *pbpA* (Fig. 55A). De la même façon, la souche 1158C portant l'allèle évolué  $pbpA^{+1}$  présente une



**A)** % survie



**B)** % survie



**Figure 55 : Effets des mutations *pbpA* identifiées dans les populations Ara-5 et Ara+1 sur la résistance des bactéries au stress osmotique.** Les différentes souches ont été cultivées en milieu LB pendant une nuit, puis diluées dans du milieu LB contenant différentes concentrations de NaCl (0, 0,1, 0,2, 0,4 et 0,6M). Les cultures ont été incubées pendant 12h, puis diluées et étalées sur des boîtes de LB-agar. Les colonies ont été dénombrées. La survie des différentes souches en présence de NaCl a été évaluée par rapport aux cultures en LB sans NaCl. La déviation standard a été calculée pour chaque expérience réalisée à partir de 4 cultures indépendantes. **A) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara-5 sur la survie des cellules lors d'un stress osmotique.** 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, Lud5 : 606 *pbpA*<sup>-5</sup>, Lud6 : Lud5 *pbpA*<sup>anc</sup>. **B) Effets de la mutation *pbpA* de la population Ara+1 sur la survie des cellules lors d'un stress osmotique.** 606 : ancêtre *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158A : clone évolué isolé à 2000 générations dans la population Ara+1, *pbpA*<sup>anc</sup>, 1158C : clone évolué isolé à 2000 générations dans la population Ara+1, *pbpA*<sup>+1</sup>, DVS53 : 1158C *pbpA*<sup>anc</sup>.

sensibilité accrue au stress osmotique par rapport aux souches 606, 1158A et DVS53 portant l'allèle ancestral de *pbpA* (Fig.55B). Les mutations *pbpA*<sup>-5</sup> et *pbpA*<sup>+1</sup> ont donc un impact négatif sur la résistance de la paroi de peptidoglycane face au stress osmotique, probablement par le biais d'une diminution de l'expression de la protéine PBP2. Ceci pourrait dénoter une réticulation moindre du réseau de peptidoglycane suite aux mutations *pbpA*.

### III.7. Discussion

L'opéron *pbpA-rodA*, impliqué dans l'élongation de la paroi de peptidoglycane, est la cible de mutations dans 6 populations sur 12 au cours de 20 000 générations d'évolution expérimentale chez *E. coli* (Woods *et al.*, 2006). Nous avons choisi d'étudier les 2 mutations ciblant les populations Ara+1 et Ara-5 et localisées au niveau de la région promotrice putative (Woods *et al.*, 2006 ; Schneider *et al.*, 2000a ; Asoh *et al.*, 1986). La mutation identifiée dans la population Ara+1 est due à l'insertion d'un élément IS150 11pb en amont du promoteur putatif de l'opéron *pbpA-rodA* (Schneider *et al.*, 2000a), tandis que la mutation identifiée dans la population Ara-5 est une mutation ponctuelle située environ 60pb en aval du promoteur putatif (Woods *et al.*, 2006) (Fig.48). Des souches isogéniques portant les allèles ancestral ou évolués de *pbpA-rodA* ont été construites grâce au plasmide suicide pKO3 afin d'étudier spécifiquement les effets de chaque mutation. Les mutations *pbpA*<sup>-5</sup> et *pbpA*<sup>+1</sup>, apparues et fixées durant les 2000 premières générations d'évolution expérimentale, période de fort accroissement de fitness, apportent un bénéfice de 4,4% et 7% respectivement. Elles entraînent une diminution de la transcription de l'opéron *pbpA-rodA*, aboutissant à une diminution du niveau d'expression de la protéine PBP2. Ceci affecte la morphologie des bactéries qui présentent alors une forme de type coque avec un volume plus important, une sensibilité accrue au stress osmotique ainsi qu'une fréquence plus importante d'apparition de mutants résistants au mécilinam. Ces mutations sont bénéfiques dans l'environnement dans lequel elles ont été sélectionnées (DM25 glucose), mais elles sont néfastes dans d'autres environnements, par exemple dans un milieu comportant une forte teneur en sel. Elles ont donc des effets pleiotropes antagonistes et participent ainsi à la spécialisation écologique des populations de la même façon que les mutations *rbs* et *malT* (Cooper et Lenski, 2000 ; Cooper *et al.*, 2001 ; Pelosi *et al.*, 2006). Les deux mutations *pbpA* ont des effets phénotypiques similaires, soulignant une fois de plus le fort degré de parallélisme phénotypique, génétique et moléculaire observé au cours de l'évolution des populations.

L'avantage apporté par ces mutations est associé à une diminution de la transcription de *pbpA*. Ceci s'explique relativement facilement dans le cas de la mutation *pbpA*<sup>+1</sup> qui correspond à l'insertion d'un élément *IS150* 11pb en amont du promoteur putatif de l'opéron *pbpA-rodA*, ce qui altère probablement la région régulatrice de cet opéron. En revanche, la mutation ponctuelle *pbpA*<sup>-5</sup> est située environ 60pb en aval du promoteur putatif de l'opéron *pbpA-rodA*. Son effet sur la transcription pourrait donc être dû à la présence d'un second promoteur ou d'une zone importante pour la transcription de cet opéron.

Ces mutations participent à l'évolution de la morphologie des populations. En effet, les 12 populations présentent une augmentation parallèle du volume cellulaire accompagnée de changements morphologiques importants. Lorsque les allèles évolués de *pbpA-rodA* des populations Ara+1 et Ara-5 sont remplacés par l'allèle ancestral, la morphologie des bactéries redevient proche de celle de l'ancêtre : le volume cellulaire diminue et les cellules ont de nouveau une morphologie de type bâtonnet. Cependant, les modifications de morphologie observées au cours de l'évolution ne peuvent pas être expliquées dans toutes les populations par des mutations de l'opéron *pbpA-rodA*. Il est possible que l'expression de cet opéron soit affectée de façon indirecte dans les populations où aucune mutation *pbpA* n'a été mise en évidence. Pour le vérifier, l'expression de fusions transcriptionnelles *PpbpA-lacZ* pourrait être étudiée dans les contextes génétiques évolués. Il est également possible que des mutations ciblant des gènes codant d'autres protéines intervenant dans le contrôle de la morphologie cellulaire (protéines PBPs, Mre, Mur...) aient été sélectionnées dans les populations ne portant pas de mutations dans l'opéron *pbpA-rodA*. Il serait donc intéressant de séquencer ces gènes dans ces populations.

La protéine PBP2 est impliquée, en partenariat avec RodA, dans la synthèse du peptidoglycane au cours de l'élongation des cellules. En effet, il a été démontré qu'elle était absente du site de septation, où la synthèse de peptidoglycane est dépendante de la protéine PBP3 (Den Blaauwen *et al.*, 2003). Dans les cellules en forme de bâtonnet, les précurseurs du peptidoglycane sont incorporés tout au long de la paroi latérale (De Pedro *et al.*, 2001). Il est possible que ce processus soit déséquilibré suite à la diminution de la quantité de PBP2, par rapport à la synthèse de peptidoglycane impliquée dans la division cellulaire. Des mutants de *pbpA* ont été reportés comme présentant un polymorphisme de taille cellulaire, issu d'une division asymétrique (Rodriguez et De Pedro, 1990). Les mêmes résultats sont obtenus avec nos mutants qui pourraient donc être affectés dans l'extension cylindrique de la paroi au profit de la synthèse de peptidoglycane au site de septation (De Pedro *et al.*, 2001). Ceci pourrait conférer un avantage sélectif aux bactéries. En effet, la synthèse latérale de la paroi a été

considérée par Den Blaauwen *et al.* (2003) comme « une voie par défaut de l'assemblage du peptidoglycane » (Den Blaauwen *et al.*, 2003). Par quel mécanisme la diminution de PBP2 pourrait-elle conduire à un déficit de synthèse latérale de peptidoglycane ? Les protéines impliquées dans ce processus pourraient s'assembler en complexes, comme c'est le cas pour la synthèse de peptidoglycane au niveau du septum (Höltje, 1998). Une des protéines participant à ce complexe pourrait être MreB, une protéine formant des structures de type actine (Kruse *et al.*, 2005). Des interactions ont d'ailleurs été mises en évidence entre les protéines de type Mre et certaines PBPs, comme PBP2 (Divakaruni *et al.*, 2005). La diminution de la quantité de PBP2 pourrait ainsi conduire à un déséquilibre au sein des complexes protéiques impliqués dans la synthèse latérale de peptidoglycane.

Les phénotypes de létalité et de blocage de la division cellulaire liés à la perte de PBP2 (Botta et Buffa, 1981 ; Ogura *et al.*, 1989) peuvent être supprimés par des mutations compensatrices conduisant à une surexpression de la protéine FtsZ impliquée dans la formation du septum (Vinella *et al.*, 1993, 2000), ou une induction de la synthèse de ppGpp aboutissant également à une activation du gène *ftsZ* (Vinella *et al.*, 1992 ; Joseleau-Petit *et al.*, 1994 ; Powell et Court, 1998). Ceci a été démontré par l'étude de mutants résistants au mécillina, qui inhibe l'activité de PBP2. Le mécillina conduit à une augmentation du volume des cellules qui présentent une morphologie sphérique. Le rapport surface/volume diminue, ce qui entraîne une diminution de la concentration de la protéine FtsZ. L'augmentation de FtsZ restaurerait donc la survie d'un mutant dépourvu de PBP2. En présence de ces mutations suppresseurs, les cellules mutées pour *pbpA* présentent alors une morphologie sphérique mais sont tout de même capables de se diviser et de survivre. La fréquence de mutations conduisant à la résistance au mécillina est plus élevée suite à la présence des allèles évolués de *pbpA*. L'analyse des mutants résistants au mécillina isolés à partir de souches portant ces allèles pourrait permettre de déterminer si un tel mécanisme de compensation a été sélectionné au cours de l'évolution, suite à la fixation des mutations *pbpA*. Ceci correspondrait à un processus analogue à celui mis en évidence pour les mutations *spoT*, c'est-à-dire que les effets pleiotropes néfastes associés aux mutations bénéfiques *pbpA* seraient compensés par d'autres mutations (section II.7).

## IV. Influence de la topologie de l'ADN sur l'adaptation des bactéries à leur environnement

---

Au cours de ma thèse, j'ai participé au projet principal de thèse d'Estelle Crozat consistant en l'étude de l'implication de la topologie de l'ADN dans l'adaptation d'*E. coli* au cours de l'évolution expérimentale. Ce projet a fait l'objet de la publication ci-jointe intitulée « Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection » (Estelle Crozat, Nadège Philippe, Richard E. Lenski, Johannes Geiselman and Dominique Schneider, 2005, *Genetics*, (169) : 523-532).

Tous les jours depuis 1988, les cultures de nuit des douze populations sont diluées dans du milieu frais. Elles sont alors soumises à une phase de latence, suivie d'une période de croissance active qui est stoppée lorsque les nutriments s'épuisent. Les cellules entrent alors en phase stationnaire jusqu'au lendemain où le retour des nutriments les place à nouveau dans des conditions favorables à leur croissance. Ces transitions croissance-carence et carence-croissance sont connues pour affecter la superhélicité globale de l'ADN (Hatfield et Benham, 2002 ; Reyes-Dominguez *et al.*, 2003 ; Balke et Gralla, 1987). Des modifications de topologie de l'ADN sont par ailleurs connues pour modifier la transcription globale des gènes (Peter *et al.*, 2004 ; Jovanovich et Lebowitz, 1987 ; Pruss et Drlica, 1989 ; Steck *et al.*, 1993 ; Gmuender *et al.*, 2001 ; Bordes *et al.*, 2003). Ceci pourrait ainsi permettre aux bactéries d'adapter rapidement l'expression de leurs gènes aux conditions de croissance, notamment lors des transitions nutritionnelles.

La superhélicité de l'ADN a été mesurée au sein des 12 populations au cours de l'évolution. Ces mesures ont été réalisées en utilisant le plasmide rapporteur pUC18, dont le niveau de superhélicité reflète celui du chromosome, sans pour autant être précisément identique (Bliska et Cozzarelli, 1987). Ce plasmide rapporteur a été introduit dans 3 clones évolués isolés à 2000, 10 000 et 20 000 générations de chacune des 12 populations, ainsi que dans le clone ancêtre. La distribution des topoïsomères plasmidiques de tous les clones évolués a été comparée à celle du clone ancêtre par électrophorèse sur gels d'agarose contenant de la chloroquine (Higgins *et al.*, 1988). Cette molécule s'intercale dans l'ADN et permet de visualiser les différents topoïsomères d'un plasmide. Les clones évolués de 10 populations sur 12 présentent une augmentation de superhélicité du chromosome à 20 000

génération par rapport à l'ancêtre. Parmi ces populations, 9 présentent des modifications importantes au cours des 2000 premières générations d'évolution expérimentale, période d'amélioration rapide du fitness (Lenski et Travisano, 1994 ; Cooper et Lenski, 2000). L'augmentation de superhélicité de l'ADN est donc un phénotype supplémentaire observé de façon parallèle dans la majorité des populations au cours de l'évolution (voir introduction section V). Des changements phénotypiques apparaissant de façon parallèle au sein de lignées indépendantes suggèrent une évolution adaptative (Bull *et al.*, 1997 ; Cooper *et al.*, 2001 ; Nosil *et al.*, 2002). L'accroissement du niveau de superhélicité de l'ADN observé dans la plupart des populations dès 2000 générations pourrait donc avoir un rôle dans l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale.

Les mutations susceptibles d'être à l'origine de cet accroissement de superhélicité ont été recherchées dans la population modèle Ara-1, utilisée dans la plupart des autres études réalisées (Papadopoulos *et al.*, 1999 ; Cooper et Lenski, 2000, ; Schneider *et al.*, 2000a ; Cooper *et al.*, 2003 ; Pelosi *et al.*, 2006). Cette population présente également l'avantage de révéler deux augmentations successives de superhélicité, l'une intervenant avant 2000 générations, l'autre après 10 000 générations. Ceci suggère l'implication d'au moins deux mutations différentes. Deux mutations ont été mises en évidence dans 2 gènes connus pour contrôler la topologie de l'ADN. Une mutation cible le gène *topA* (H33Y), codant la topoisomérase I qui diminue la superhélicité négative de l'ADN, tandis que l'autre modifie le site de fixation des ribosomes (RBS) du gène *fis*, codant une protéine de type histone (Dorman et Deighan, 2003, Schneider *et al.*, 1999). La présence de ces mutations a été recherchée chez une cinquantaine de clones isolés à 500, 1000, 1500, 2000 et 10 000 générations, ce qui a permis de déterminer leur dynamique de fixation au sein de la population Ara-1. La mutation du gène *topA* est apparue avant 500 générations et a été fixée entre 1000 et 1500 générations, bien avant la mutation du gène *fis* qui a été fixée après 10 000 générations. Ceci correspond aux deux périodes où des changements de superhélicité ont été mesurés dans cette population.

Afin d'analyser les effets phénotypiques de ces mutations, elles ont été introduites seules ou en combinaison dans le contexte génétique ancestral, au moyen du plasmide suicide pKO3. Ceci a permis d'obtenir plusieurs souches ancestrales isogéniques à l'exception des allèles *topA* et/ou *fis*. De la même façon, un clone isolé à 2000 générations dans la population Ara-1 a été modifié par remplacement de l'allèle évolué de *topA* par son allèle ancestral. Ces différentes constructions ont permis d'étudier l'effet des deux mutations sur la topologie de l'ADN, le fitness des bactéries, mais aussi sur l'activité de TopA et l'expression de Fis.

Des mesures de topologie de l'ADN ont été effectuées de la même façon que précédemment sur les souches portant les allèles évolués ou ancestraux de *topA* et *fis*. Chacune des deux mutations augmente la superhélicité négative de l'ADN plasmidique dans le contexte génétique de l'ancêtre. La mutation *topA* reproduit le changement de topologie observé chez les clones évolués isolés à 2000 générations dans la population Ara-1, tandis que les deux mutations combinées reproduisent les changements de topologie observés chez les clones évolués isolés à 20 000 générations. Ce résultat est étroitement corrélé à la dynamique de fixation des mutations : la première augmentation de superhélicité correspondrait à la fixation de la mutation dans le gène *topA*, tandis que la deuxième correspondrait à la fixation de la mutation du gène *fis*. Ces deux mutations semblent donc responsables à elles seules de toutes les modifications de superhélicité observées dans la population Ara-1.

Des expériences de compétition ont été réalisées entre les clones ancêtre portant les allèles évolués et ancestraux des gènes *topA* et *fis*. Ces expériences ont permis de montrer que l'allèle évolué du gène *topA* apporte un bénéfice très important de 13%, alors que l'allèle évolué du gène *fis* est bénéfique de 3% environ. Lorsque les deux mutations sont combinées, le gain de fitness est d'environ 16%. Ces deux mutations permettent donc l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale. Elles ont un effet additif aussi bien en terme d'augmentation de superhélicité de l'ADN que de fitness.

La mutation dans le gène *topA* touche un résidu très conservé (Chen et Wang, 1998) du domaine I de la topoisomérase I (N-terminal), probablement impliqué dans l'interaction avec l'ADN (Lima *et al.*, 1994). La topoisomérase I a pour rôle de diminuer la superhélicité négative de l'ADN. L'allèle *topA* évolué entraînant une augmentation de superhélicité, il provoque probablement une baisse de l'activité de la topoisomérase I. L'effet de la mutation découverte dans le RBS du gène *fis* sur l'expression de la protéine Fis a été analysé par Western-blot en utilisant des anticorps dirigés contre Fis. Cette mutation provoque une diminution de la quantité de Fis, qui est un répresseur transcriptionnel de l'expression de *gyrA* et *gyrB* codant la gyrase (Schneider *et al.*, 1999). Ceci pourrait donc expliquer l'augmentation de superhélicité de l'ADN induite par cette mutation. Cette mutation est en cours d'étude par Estelle Crozat.

La mutation *topA* est détectée de façon très précoce (avant 500 générations) et ce dans 1/3 des individus présents à ce temps évolutif. Une mutation apportant un tel avantage (13%) aurait dû être fixée en moins de 200 générations (Lenski *et al.*, 1991), c'est-à-dire bien

avant 1000 générations. Or il faut attendre 1500 générations pour que tous les individus analysés présentent l'allèle évolué du gène *topA*. Ceci pourrait être dû à un phénomène appelé interférence clonale. A une même étape de l'évolution, la population peut en effet être composée de plusieurs sous-populations constituées de cellules portant des mutations bénéfiques différentes mais apportant un avantage équivalent (Gerrish et Lenski, 1998). Cette compétition entraîne alors un retard de fixation d'une des mutations. Il faut en effet attendre qu'une seconde mutation bénéfique apparaisse dans une des sous-populations, et que cette mutation confère une augmentation suffisante du fitness, pour permettre la fixation de la sous-population correspondante aux dépens des autres. A 1000 générations, la population Ara-1 serait donc constituée d'au moins 2 sous-populations, l'une composée de cellules portant l'allèle évolué de *topA*, l'autre de bactéries portant l'allèle ancestral de *topA* mais comportant une ou plusieurs autres mutations bénéfiques. Le fitness et le niveau de superhélicité de 4 clones évolués isolés à 1000 générations au sein de la population Ara-1 ont été mesurés, 2 clones ne portant pas l'allèle évolué de *topA*. Ces 4 clones présentent un fitness et une topologie de l'ADN similaires. Ce résultat signifie donc que les clones ne possédant pas l'allèle évolué de *topA* portent une ou plusieurs autres mutations ayant un effet équivalent sur le fitness. La topologie de l'ADN étant la même que pour la sous-population portant l'allèle évolué de *topA*, il est probable qu'une de ces autres mutations bénéfiques affecte également un gène impliqué dans le contrôle de la superhélicité de l'ADN.

Ces expériences ont donc permis de mettre en évidence une nouvelle classe de mutations permettant l'adaptation des bactéries aux conditions de l'évolution expérimentale. Elles affectent le degré de superhélicité de l'ADN qui est un point de contrôle des transitions nutritionnelles et de la réponse aux stress chez les bactéries. La superhélicité de l'ADN est une cible majeure de la sélection naturelle. En effet, l'accroissement de superhélicité a été mis en évidence de façon parallèle dans la majorité des populations mais également chez différentes sous-populations au sein d'une même population.



## Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA Topology as a Key Target of Selection

Estelle Crozat,\* Nadège Philippe,\* Richard E. Lenski,<sup>†</sup> Johannes Geiselmann\*  
and Dominique Schneider\*<sup>1</sup>

\*Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, CNRS  
UMR 5163, F-38041 Grenoble, France and <sup>†</sup>Department of Microbiology and Molecular Genetics,  
Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824

Manuscript received September 3, 2004  
Accepted for publication October 29, 2004

### ABSTRACT

The genetic bases of adaptation are being investigated in 12 populations of *Escherichia coli*, founded from a common ancestor and serially propagated for 20,000 generations, during which time they achieved substantial fitness gains. Each day, populations alternated between active growth and nutrient exhaustion. DNA supercoiling in bacteria is influenced by nutritional state, and DNA topology helps coordinate the overall pattern of gene expression in response to environmental changes. We therefore examined whether the genetic controls over supercoiling might have changed during the evolution experiment. Parallel changes in topology occurred in most populations, with the level of DNA supercoiling increasing, usually in the first 2000 generations. Two mutations in the *topA* and *fis* genes that control supercoiling were discovered in a population that served as the focus for further investigation. Moving the mutations, alone and in combination, into the ancestral background had an additive effect on supercoiling, and together they reproduced the net change in DNA topology observed in this population. Moreover, both mutations were beneficial in competition experiments. Clonal interference involving other beneficial DNA topology mutations was also detected. These findings define a new class of fitness-enhancing mutations and indicate that the control of DNA supercoiling can be a key target of selection in evolving bacterial populations.

EVOLUTION experiments allow one to study the dynamics and genetic bases of microbial evolution, and this approach has become increasingly widespread in recent years (ELENA and LENSKI 2003). The longest-running evolution experiment involves 12 populations of *Escherichia coli* founded from the same ancestral strain, which have been serially propagated in the same glucose-limited medium for >20,000 generations (LENSKI *et al.* 1991; LENSKI and TRAVISANO 1994; COOPER and LENSKI 2000; LENSKI 2004). The populations improved their performance as demonstrated by the large fitness gains seen when the evolved bacteria compete against their ancestor in the same environment (COOPER and LENSKI 2000). Many genetic changes have been found in these evolved lines including point mutations, deletions, inversions, and insertions of insertion sequence elements (SNIEGOWSKI *et al.* 1997; PAPADOPOULOS *et al.* 1999; SCHNEIDER *et al.* 2000; COOPER *et al.* 2001a, 2003; LENSKI *et al.* 2003). To date, mutations at two loci (*rbs* and *spoT*) have been conclusively demonstrated to be beneficial in the evolutionary environment (COOPER *et al.* 2001a, 2003), but their effects explain only a small

fraction of the total fitness improvement. Both loci are mutated in most or all of the independently derived lineages, indicating parallel adaptive evolution.

In the experiment cited above, each day the evolving populations experienced a lag phase followed by exponential growth, then depletion of the limiting glucose, and finally stationary phase (until transfer into fresh medium the next day). Such transitions are known to influence DNA topology (HATFIELD and BENHAM 2002; REYES-DOMINGUEZ *et al.* 2003). DNA supercoiling is dynamically modified during many environmental challenges, including the transition from growth to stationary phase (BALKE and GRALLA 1987), nutrient upshift (REYES-DOMINGUEZ *et al.* 2003), anaerobiosis (BHRIAN *et al.* 1989), thermal stress (GOLDSTEIN and DRLICA 1984), oxidative stress (WEINSTEIN-FISCHER *et al.* 2000), osmotic stress (HIGGINS *et al.* 1988), and acid stress (KAREM and FOSTER 1993). Phenotypic acclimation by bacteria to these challenges requires rapid changes in expression of many genes, and one important acclimatory response is the transient modification of supercoiling, which can produce genome-wide changes in rates of transcription (JOVANOVIĆ and LEBOWITZ 1987; PRUSS and DRLICA 1989; STECK *et al.* 1993; GMUENDER *et al.* 2001). The topology of DNA therefore helps to coordinate the gene regulatory networks of bacteria in response to varying environments. The maintenance of

<sup>1</sup>Corresponding author: Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Facultés Médecine/Pharmacie, Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, 38700 La Tronche, France.  
E-mail: dominique.schneider@ujf-grenoble.fr

proper DNA topology is also required for cell viability, since it affects many processes in bacteria including replication, repair, transcription, recombination, and transposition. The level of DNA supercoiling is tightly regulated in the cell by the combined activities of topoisomerases (CHAMPOUX 2001) and histone-like proteins (DORMAN and DEIGHAN 2003). In *E. coli*, three main topoisomerases are involved in maintaining DNA supercoiling: topoisomerases I (WANG 1971) and IV (ZECHIEDRICH *et al.* 2000) relax DNA, while DNA gyrase introduces negative supercoils (GELLERT *et al.* 1976). Histone-like proteins constrain the supercoiling level by binding to DNA and regulating the expression of the topoisomerase-encoding genes (DORMAN and DEIGHAN 2003).

In this study, we sought to determine whether the level of DNA supercoiling might have changed during the evolution experiment, because the populations experienced daily challenges of nutrient upshift and exhaustion. If so, such changes would suggest candidate loci for further study by sequencing, genetic manipulation, and analyses of phenotypic effects.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains, plasmids, and culture conditions:** Twelve populations of *E. coli* B were started from two genotypes that differed by only a single neutral marker (arabinose utilization), and they were propagated for 20,000 generations at 37° in a glucose-limited defined medium (LENSKI *et al.* 1991; LENSKI and TRAVISANO 1994; COOPER and LENSKI 2000; LENSKI 2004). Six populations, designated Ara-1–Ara-6, were founded from the ancestor that is Ara<sup>−</sup> (unable to use arabinose as a carbon source) and six others, Ara+1–Ara+6, from an Ara<sup>+</sup> revertant of the ancestor. The arabinose utilization phenotype serves as a marker in competition experiments and was shown to be neutral under these conditions (LENSKI *et al.* 1991). We used three clones sampled at random from each of the 12 populations at generations 2000, 10,000, and 20,000 (COOPER and LENSKI 2000). Population Ara-1 served as the focal population in this study and was the source of the evolved *topA* and *fis* alleles. Strain 606 *fis*<sup>Δ</sup> has an in-frame *fis* deletion and was constructed (D. SCHNEIDER, unpublished data) using the suicide-plasmid pKO3 (LINK *et al.* 1997). This deletion construct is presumed to be otherwise isogenic to the ancestor (REL606) and was used as a control in immunoblot analyses.

We used plasmids pUC18 (YANISCH-PERRON *et al.* 1985) for DNA supercoiling measurements, pKO3 (LINK *et al.* 1997) for allele replacements, and pCRII-Topo (Invitrogen, San Diego) for cloning experiments.

All experiments were performed by growing strains either in the same Davis glucose (25 μg/ml) minimal medium (DM25) that was used in the evolution experiment (LENSKI *et al.* 1991) or in rich Luria broth (LB) medium (SAMBROOK *et al.* 1989). Ampicillin (100 μg/ml), chloramphenicol (30 μg/ml), or kanamycin (50 μg/ml) were added as needed.

**DNA supercoiling measurements:** Topological changes during evolution were measured by analyzing the relative abundance of different topoisomers of a reporter plasmid. The pUC18 plasmid was introduced to various strains by electroporation (Bio-Rad, Richmond, CA, 200 ohm, 25 μF, 2.5 kV). Electrocompetent cells were prepared as described elsewhere (SAMBROOK *et al.* 1989). It should be noted that the way we measured DNA topology allowed us to assess changes

only in the activity of the nicking-closing enzymes (*i.e.*, topoisomerases). The superhelix density *in vivo* is also affected by other DNA-binding proteins (LILLEY 1986; BLISKA and COZZARELLI 1987).

Bacteria containing pUC18 were grown in LB to an OD<sub>600nm</sub> = 2 (or in DM25 to the end of exponential growth). Cells were harvested and pUC18 was extracted using the QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA). The same amount of plasmid DNA (200 ng) from each strain was loaded onto 1% agarose gels containing 1.5 μg/ml chloroquine. The gels were run overnight at 4° at 3 V/cm. Under these conditions, more highly supercoiled topoisomers migrate faster (HIGGINS *et al.* 1988). Chloroquine was washed from the gels by soaking for 4 hr in water, and photographs were taken under UV light after ethidium bromide staining. Because such gels are sensitive to buffer conditions, we checked that negative supercoils occur under the chloroquine concentration that we used. It is known that the relative mobility of the different topoisomers varies with chloroquine concentrations (HIGGINS *et al.* 1988); at a concentration of 25 μg/ml, more supercoiled topoisomers migrate more slowly, while more relaxed ones migrate faster. As expected, at that higher concentration, we obtained the symmetrical outcomes compared to those obtained at a chloroquine concentration of 1.5 μg/ml (data not shown).

Quantitative comparisons of DNA topology between each evolved clone and the ancestor were performed by scanning the relevant gels. Densitometric analyses were performed to obtain the relative abundance of all of the plasmid topoisomers for each clone, and the average topoisomer value was computed from these data for each clone, including the ancestor. To estimate the level of DNA supercoiling, mean  $\sigma$ -values were calculated according to the formula  $\sigma = \Delta \text{Lk} / \text{Lk}_0$ , where  $\Delta \text{Lk}$  is the difference in the linking number (*i.e.*, difference in average topoisomer value) between two clones and  $\text{Lk}_0$  for pUC18 is 2686 bp/10.45 bp/turn = 257. The  $\sigma$ -value for the ancestor was expressed relative to the midpoint topoisomer of plasmid that was completely relaxed by using calf-thymus topoisomerase I and assigned  $\sigma = 0$ . Comparing the topoisomer distribution of plasmid DNA from the ancestor with the completely relaxed plasmid control yielded an estimate of  $\sigma = -0.066$  for the ancestor. We emphasize that the midpoint topoisomer of the completely relaxed plasmid was used only to establish a baseline value. All comparisons between evolved clones and the ancestor and between the various isogenic constructs used the complete distribution of topoisomers obtained by densitometry. The  $\sigma$ -value for each evolved clone or isogenic construct was obtained by adding or subtracting its average topoisomer value to that of the ancestor for more supercoiled or more relaxed molecules, respectively. For conversion, one negative supercoil difference corresponds to a difference in  $\sigma$  of  $-0.0039$ . The resulting  $\sigma$ -value for each evolved clone and isogenic construct was then compared to that of the ancestor. These analyses thus allowed a precise quantitative comparison of the distribution of plasmid topoisomers between each clone and the ancestor.

Changes in DNA topology were measured after growing the various clones in LB medium. However, the populations had evolved in a glucose-limited minimal medium. Therefore, we also measured the supercoiling of the reporter plasmid after growth in the same minimal medium as used in the evolution experiment. Cell densities and molecular yields are lower in the minimal medium, but similar changes in DNA topology were observed in minimal and LB media (data not shown). All subsequent experiments on supercoiling were performed using cells grown in LB medium.

**Electrophoresis and immunoblot analyses of proteins:** Triplicate cultures of the ancestor carrying the ancestral *fis* allele,

an evolved *fis* allele, or a complete deletion of *fis* were prepared in LB, and aliquots were sampled after 1, 1.5, 2.5, and 5 hr of incubation at 37°. (Under these conditions, the duration of the lag phase was ~0.75 hr, and after ~5 hr the cultures enter into stationary phase.) Cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT) before sonication. After centrifugation at 10,000 × *g* for 30 min at 4°, total protein concentrations were determined using the Bradford protein assay kit (Bio-Rad) and with bovine serum albumin as a standard. Equal amounts of protein samples were subjected to 16% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the separated proteins were then electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Amersham Pharmacia). Prestained protein standards (Amersham, Buckinghamshire, UK) were used for molecular weight estimation. Immunoblot analyses were performed with antibodies against *Fis* and *RpoA* (courtesy of A. Ishihama and M. Cashel, respectively). The blots were developed using ECL (Amersham Pharmacia) or nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Sigma) systems, and the staining intensity was quantified using the ImageGauge (Fujifilm) software.

**Strain construction:** The *topA* and *fis* mutations, alone and in combination, were introduced into the ancestral genetic background by using the suicide plasmid pKO3 (LINK *et al.* 1997). Briefly, a PCR product containing ~500 bp of adjacent sequences on each side of the mutation first was cloned into pCRII-Topo and then subcloned into pKO3. After electrotransformation of the ancestor with the appropriate plasmid, chloramphenicol-resistant cells with a copy of this nonreplicative plasmid that had integrated into the chromosome were selected at high temperature. Subsequent selection on 5% sucrose-LB plates without NaCl (BLOMFELD *et al.* 1991) allows detection of plasmid loss, because the plasmid carries *sacB*, which renders cells sensitive to killing by sucrose. These plasmid-free cells were then screened for the presence of the evolved *topA* allele by PCR/restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) using *Nmu*CI (Fermentas) to distinguish between ancestral and evolved alleles or for the presence of the *fis* allele by direct sequencing. As a further control for the precision of these manipulations, constructed strains were “deconstructed” (the introduced evolved alleles were replaced again by their ancestral counterparts, using pKO3) to check for unintended secondary mutations (COOPER *et al.* 2003); in all cases, the deconstructed strains were confirmed to have reversed the phenotypic effects of the introduced *topA* and *fis* evolved alleles. The same approach was used to replace the evolved alleles by the ancestral ones in some evolved clones.

**Fitness assays:** The relative fitness of two strains was estimated by directly competing them, as described elsewhere (LENSKI *et al.* 1991). Briefly, isogenic ancestral strains with the introduced evolved *topA* allele, the evolved *fis* allele, or both were allowed to compete against the ancestor carrying the opposite neutral Ara marker (LENSKI *et al.* 1991). Each pairwise competition was replicated at least fourfold, with competitions running for 1 day or, with 1:100 daily serial transfer, for 6 days (longer duration allows detection of smaller fitness effects) in the same medium as the evolution experiment. Both 1-day and 6-day competitions include all the same phases of population growth that occur in the serial-transfer regime, including a lag-phase prior growth, exponential growth, depletion of the limiting glucose, and stationary phase (VASI *et al.* 1994). In both cases, competitors were separately acclimated to the same regime, then transferred together from stationary-phase cultures into fresh medium (with 1:200 dilution each, thus 1:100 combined). Samples of the competition assays were taken to measure the abundance of the competitors; these samples were always taken in stationary phase (24 hr after the previous transfer), such that only the duration of the competi-

tions varied and not the physiological state of the cells or the time they spent in various states. Fitness was calculated as the ratio of the realized (net) population growth rates obtained for the two strains while they competed with one another; *t*-tests were performed to evaluate whether measured fitness values differed significantly from the null hypothetical value of one. The same basic protocol was also used to assess fitness variation among clones sampled from the evolution experiment; a one-way ANOVA was then performed to test whether there was significant variation in fitness among the clones.

**Evolutionary dynamics of mutation substitutions:** PCR/RFLP strategies were used to track the origin and spread of the mutations discovered in the focal population, using clones isolated from samples frozen during the evolution experiment. For the *topA* locus, numerous clones from generations 500, 1000, 1500, and 2000 were subjected to PCR using primers ODS177 (5'-GACTACGTGGTGAATCCAG-3') and ODS178 (5'-ACCAGGCAACACTTCATAGTG-3'). The presence or absence of the evolved *topA* mutation was determined by *Nmu*CI digestion of the PCR products. The evolved *fis* allele does not change any restriction sites. Therefore, PCR products obtained with primers ODS65 (5'-GTACCGAATTGCACGTAAAG-3') and ODS141 (5'-CACCGTGAATAATGGTCTTAG-3') for many clones isolated from 2000, 10,000, and 20,000 generations were directly sequenced using primer ODS65.

## RESULTS

**DNA topology changed during experimental evolution:** To investigate DNA supercoiling, we examined reporter plasmid DNA that was introduced into, and then isolated from, 108 evolved clones (3 clones from each of the 12 long-term populations for each of three time points: 2000, 10,000, and 20,000 generations; COOPER and LENSKI 2000). All measures were compared to the ancestor clone harboring the same reporter plasmid. The ancestor and evolved clones were grown in rich medium and, upon reaching stationary phase, plasmid DNA was extracted, quantified, and loaded onto chloroquine-agarose gels to separate topoisomers and visualize their distribution. In all cases, the 3 evolved clones from the same population and same generation gave identical results.

Three main trends emerge from the levels of DNA supercoiling observed in the various evolved clones relative to that measured in the ancestor (Figure 1). First, 10 of the 12 populations at generation 20,000 show increased supercoiling relative to their ancestor. Second, alterations of the DNA topology began early in the evolution experiment, with 9 populations showing changes by 2000 generations. These initial 2000 generations were also the period of most rapid fitness improvement (LENSKI and TRAVISANO 1994; COOPER and LENSKI 2000). Third, three populations showed continued increases in supercoiling over time, in one case reaching a final  $\sigma$ -value difference of ~12% and in two others of ~17% relative to the ancestral state.

Only a few exceptions to these general trends were observed (Figure 1). In population Ara+1, the change in supercoiling was seen only transiently at 2000 generations. In Ara+3, supercoiling initially increased but be-



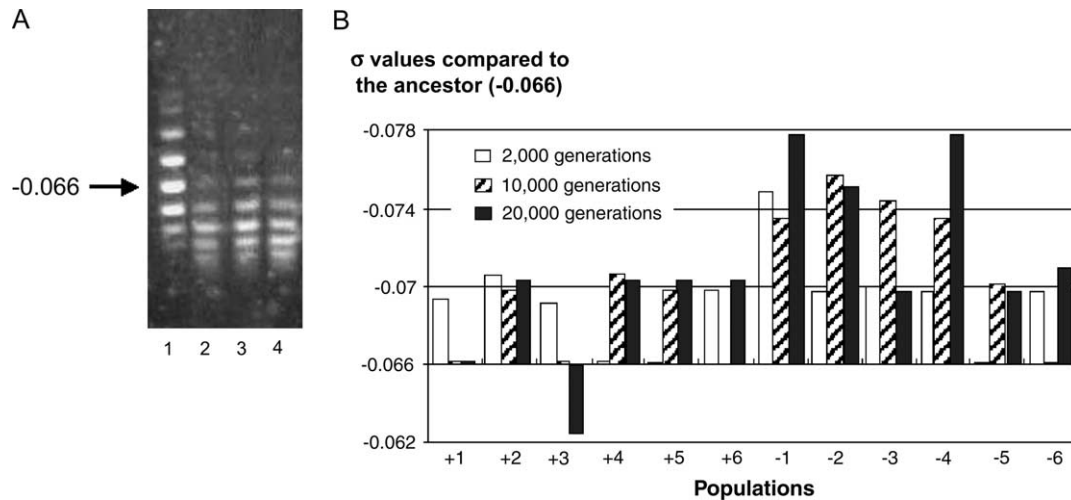


FIGURE 1.—Parallel changes in DNA topology during experimental evolution. Plasmid DNA was isolated from ancestral and evolved cells carrying reporter plasmid pUC18 and analyzed by electrophoresis on gels that allow visualization of the topoisomer distribution, with more tightly supercoiled topoisomers migrating faster (HIGGINS *et al.* 1988). (A) Gel for population Ara-1 with pUC18 extracted from the ancestor clone (lane 1) and evolved clones from 2000, 10,000, and 20,000 generations (lanes 2–4, respectively). Quantitative comparisons between each evolved clone and the ancestor are based on densitometric analyses of the gels (see MATERIALS AND METHODS). The indicated  $\sigma$ -value for the ancestor clone ( $-0.066$ ) was obtained relative to the midpoint topoisomer of plasmid completely relaxed with calf-thymus topoisomerase I (see MATERIALS AND METHODS). (B) The change in supercoiling level is shown by bars for each evolved population, labeled as +1–+6 (Ara+1–Ara+6) and –1 to –6 (Ara-1–Ara-6). Open, hatched, and solid bars represent clones isolated at 2000, 10,000, and 20,000 generations, respectively. The  $\sigma$ -values calculated in evolved clones are compared to the ancestral level ( $-0.066$ ), such that higher absolute values show increased supercoiling and lower absolute values indicate relaxation of DNA. The absence of a bar for +6 at 10,000 generations indicates that no measurement could be obtained (see text). Otherwise, short bars indicate the absence of any change in supercoiling.

came more relaxed than the ancestral state at 20,000 generations. In population Ara+6, the supercoiling level could not be measured for the 10,000-generation clones, because they grew slowly under the ampicillin selection required for maintenance of the reporter plasmid, and no plasmid DNA could be recovered. However, increased supercoiling was seen at 2000 and 20,000 generations in this population. Finally, Ara-6 showed no change in supercoiling at 10,000 generations, whereas it was increased at 2000 and 20,000 generations. During the course of the evolution experiment, four populations became mutators (SNIEGOWSKI *et al.* 1997; COOPER and LENSKEI 2000), including Ara+3, Ara+6, Ara-2, and Ara-4. There is no apparent association of the evolved changes in DNA topology with mutator status.

Summarizing to this point, our results show consistent and parallel changes in the DNA supercoiling level in most evolved populations, with many changes already seen by 2000 generations. Rapid and parallel changes across independent lineages are indicative of adaptive evolution (BULL *et al.* 1997; COOPER *et al.* 2001a; NOSIL *et al.* 2002). These data therefore strongly suggest that the parallel changes in DNA topology are adaptive. To test this hypothesis further, we sought to identify the mutations responsible for increased supercoiling among the various genes involved in the control of DNA topology. We focused on changes in population Ara-1 for two

reasons. First, this population has served as a focal lineage in several other studies of the long-term lines (PAPADOPOULOS *et al.* 1999; COOPER and LENSKEI 2000; SCHNEIDER *et al.* 2000; COOPER *et al.* 2003). Second, the supercoiling level in this population increased in at least two successive steps, implicating the involvement of at least two mutations (Figure 1).

**Identification of mutations altering DNA topology:** By sequencing candidate loci in a clone isolated at 20,000 generations from population Ara-1, we found two mutations. One mutation is in *topA*, which encodes topoisomerase I, which in turn relaxes DNA (WANG 1971). The other mutation occurs in *fis*, which encodes the Fis protein that controls the level of DNA supercoiling (SCHNEIDER *et al.* 1999). The mutation in *topA* is a C-to-T substitution, leading to the change of the histidine 33 residue of topoisomerase I into a tyrosine. The mutation in *fis* is an A-to-C substitution, which lies four nucleotides upstream of the ATG translational start codon.

To analyze precisely the phenotypic effects of these two mutations, we constructed a set of isogenic strains by allelic replacements. We moved each mutation alone and in combination into the ancestral chromosome, replacing the corresponding ancestral allele. We also replaced the evolved alleles with their ancestral counterparts in some evolved clones. These isogenic strains, with

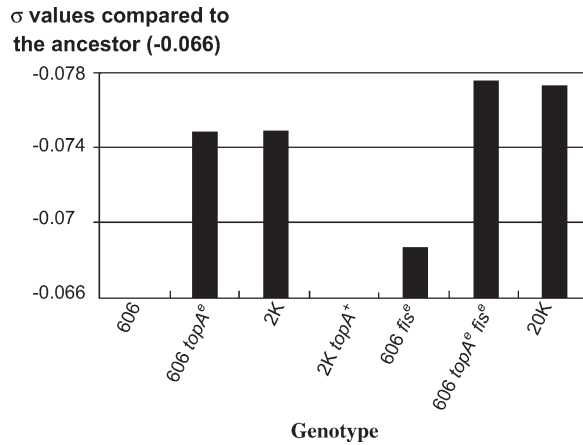


FIGURE 2.—Changes in DNA supercoiling generated by evolved *topA* and *fis* mutations. The changes in  $\sigma$ -values relative to the ancestral level ( $-0.066$ ) are shown for various strains. The strain 606 is the ancestral strain; 2K and 20K are clones isolated from population Ara-1 at 2000 and 20,000 generations, respectively. All others are isogenic constructs made by replacing ancestral alleles with evolved alleles (denoted by superscript *e*) or by replacing an evolved allele with its ancestral counterpart (superscript +).

and without the *topA* and *fis* mutations, were then used to examine the effects of the evolved alleles on DNA supercoiling and on competitive fitness.

**Both mutations contribute to altered DNA topology:**

The reporter plasmid was introduced into the isogenic strains, which were grown in LB, their plasmids extracted, and DNA topology measured as before. As shown in Figure 2, both the *topA* and *fis* mutations, when introduced separately into the ancestral chromosome, caused increases in DNA supercoiling. The *topA* mutation increased the  $\sigma$ -value by  $\sim 12\%$ , whereas the *fis* mutation increased it by  $\sim 5\%$ . When combined in the ancestral background, the two mutations had an additive effect, leading to a net increase of 17% relative to the ancestor. The effect of the *topA* mutation reproduces the DNA supercoiling level measured in clones from generation 2000 in population Ara-1, while the combined effects of the *topA* and *fis* mutations match the supercoiling observed in the 20,000-generation clones (Figure 2). Thus, the two mutations are sufficient to explain the observed changes in DNA topology in this population.

These changes suggest the substitution of the *topA* mutation before 2000 generations and the substitution of the *fis* mutation sometime later. Sequencing *topA* in a 2000-generation clone confirmed the presence of the same evolved allele as found at 20,000 generations. Replacing the evolved *topA* allele in the same 2000-generation clone with the ancestral allele restored supercoiling to the ancestral level (Figure 2). This result also precludes the presence at 2000 generations of compensatory mutations in the *gyrAB* genes, which have been

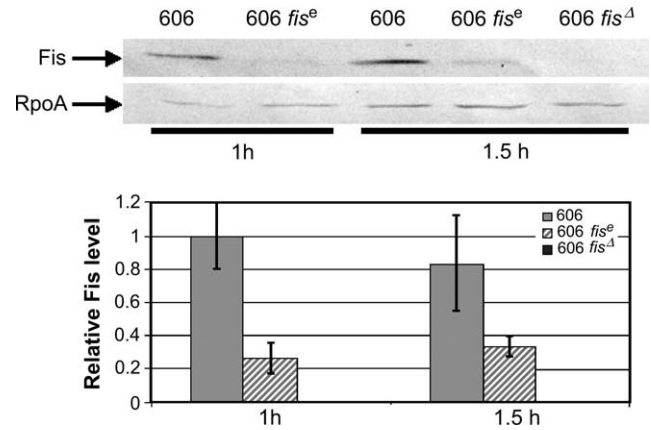


FIGURE 3.—Relative levels of Fis protein. Extracts were prepared from the ancestral strain (606), an isogenic strain with the evolved *fis* allele (606 *fis*<sup>e</sup>), and a *fis*-deleted derivative of the ancestor (606 *fis*<sup>Δ</sup>) after 1 and 1.5 hr of exponential growth in LB medium. Western blots and immunodetection assays are shown for an anti-Fis antibody (top) and, as a control, an anti-RpoA antibody (middle). (Bottom) The ratio of Fis to RpoA levels in the same strains, based on three replicate experiments with error bars indicating standard deviations. The ratio is arbitrarily set to 1 for the ancestral strain after 1 hr of exponential growth. No Fis protein was detected in the control strain with the *fis* gene deleted.

found elsewhere to compensate for certain mutations in *topA* (DiNARDO *et al.* 1982; PRUSS *et al.* 1982). The absence of mutations in *gyrAB* was confirmed by sequencing the entirety of these genes in the 2000-generation clone. These data also imply a reduction of the DNA-relaxing activity of topoisomerase I in the evolved clones, because this protein otherwise reduces supercoiling.

To analyze the effect of the evolved *fis* mutation, we performed Western blot experiments and immunodetection using an antibody raised against Fis, with an antibody raised against RpoA serving as a control (Figure 3). We used three variants of the ancestral strain that carried the ancestral *fis* allele, the evolved *fis* allele, or a deletion of the *fis* gene. As expected (MALLIK *et al.* 2004), the Fis level peaked during exponential growth in the ancestor (data not shown). The evolved *fis* allele had somewhat less than half the ancestral level of Fis protein, while the *fis*-deletion strain produced no detectable Fis (Figure 3). The level of the control protein did not differ between these strains.

**Beneficial fitness effects of *topA* and *fis* mutations and their dynamics:** To evaluate the fitness effects of the mutations responsible for the altered DNA topology in the focal population, we performed competitions between the ancestral strain with the evolved *topA* allele only, the evolved *fis* allele only, both evolved alleles, or both ancestral alleles, under the same culture conditions that prevailed during the long-term evolution experiment (Figure 4). In each case, the genotype of interest competed against a variant of the ancestor bearing a neutral marker (arabinose utilization) that allowed

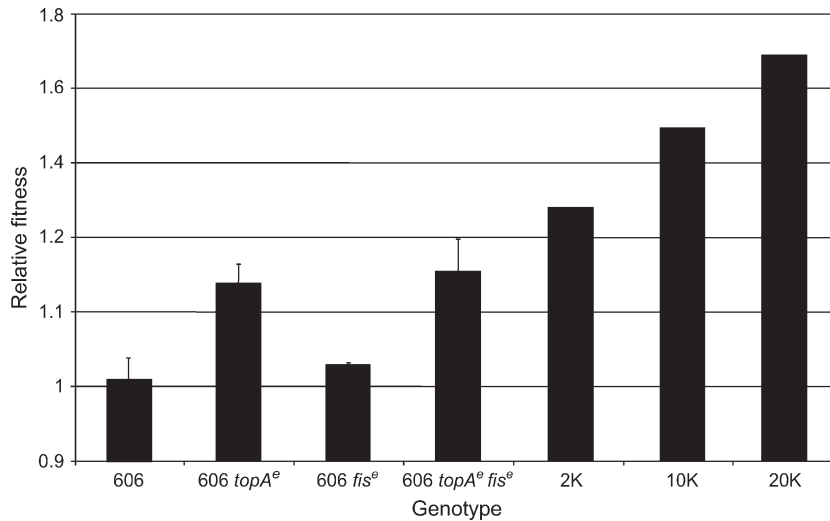


FIGURE 4.—Fitness effects of the evolved DNA topology-altering mutations in the ancestral genetic background. Competition experiments were performed in the same medium used in the long-term evolution. Error bars are 95% confidence intervals based on 16, 11, 4, and 6 replicate competition assays for each genotype (left to right). The strain 606 is the ancestor; *topA*<sup>°</sup> and *fis*<sup>°</sup> are alleles that evolved in focal population Ara-1 and then were moved, alone or in combination, into the ancestral chromosome. For comparison, we also show the mean fitness for population Ara-1 at three time points: 2000 (2K), 10,000 (10K), and 20,000 (20K) generations. The value shown for 2K is the average of values obtained by LENSKI *et al.* (1991) and by LENSKI and TRAVISANO (1994); the value for 10K is the average of values obtained by LENSKI and TRAVISANO (1994) and by COOPER and LENSKI (2000); and the value for 20K is from COOPER and LENSKI (2000).

the strains to be distinguished. As shown in prior studies (LENSKI *et al.* 1991), this marker had no discernible effect on fitness ( $H_0 = 1$ ,  $t$ -test,  $t_s = 0.4293$ ,  $P = 0.6738$ ). Each evolved allele was beneficial by itself, with fitness relative to the ancestral allele of 1.133 for the *topA* mutation ( $H_0 = 1$ ,  $t$ -test,  $t_s = 10.58$ ,  $P < 0.0001$ ) and 1.029 for the *fis* mutation ( $H_0 = 1$ ,  $t$ -test,  $t_s = 41.14$ ,  $P < 0.0001$ ). Combining the two mutations gave a relative fitness of 1.155, which does not differ significantly from the fitness predicted by a simple additive model ( $13.3\% + 2.9\% = 16.2\%$ ). Also, these gains were eliminated when each evolved allele was replaced again by the ancestral allele (data not shown), confirming that the gains were caused by the *topA* and *fis* mutations rather than by some hypothetical secondary mutations that might have accidentally occurred during the strain constructions. In addition, replacing each evolved allele with the corresponding ancestral allele in evolved clones reduced their fitness relative to the otherwise isogenic evolved clones, as would be expected if these mutations were beneficial (data not shown). Thus, increasing DNA supercoiling had a beneficial effect during evolution in the experimental culture regime.

To examine in detail the temporal dynamics of the appearance and substitution of the evolved *topA* allele in population Ara-1, we performed PCR/RFLP experiments (see MATERIALS AND METHODS) using a total of 180 evolved clones isolated at generations 500, 1000, 1500, and 2000. The *topA* mutation was present in 22/45 clones at 500 generations and in 19/45 clones at 1000 generations, and it was present in 45/45 clones at both 1500 and 2000 generations. Thus, it contributed to the early large gain in fitness, existed as a polymorphism for some time (probably indicating clonal interference from other beneficial mutations; see below), and then reached fixation. Another beneficial mutation,

in the *spoT* gene, was recently shown to have arisen somewhat later in the same population (COOPER *et al.* 2003).

We performed similar analyses for the evolved *fis* allele. This allele was not found in any of 50 clones isolated at 2000 generations, but was present in 15/37 clones at 10,000 generations. Therefore, the evolved *fis* allele contributed to the later, slower increase in fitness. The dynamics of the evolved *topA* and *fis* alleles match the observed changes in supercoiling (Figures 1 and 2). The *topA* allele was substituted by 2000 generations, and it induced the  $\sim 12\%$  change seen at that time in the Ara-1 population. The *fis* mutation, absent at 2000 generations and substituted later, induces an additional  $\sim 5\%$  change, leading to the  $\sim 17\%$  net change in supercoiling seen at 20,000 generations.

**Clonal interference and DNA topology as a key target of selection:** Given the large fitness benefit of the *topA* mutation and its presence in about half the clones at 500 generations, one might have expected its complete fixation by 1000 generations. On the basis of its fitness advantage of  $>10\%$  (Figure 4), the *topA* mutation, if unimpeded, would require  $<500$  generations to reach 100% frequency (LENSKI *et al.* 1991). However, competition between subpopulations carrying different beneficial mutations—known as “clonal interference”—can prolong the time required for substitution (GERRISH and LENSKI 1998). To examine this possibility, we sought to determine whether other clones present at the same time had similar fitness but lacked the evolved *topA* allele. Recall that the focal population at generation 1000 had two subpopulations: one had the evolved *topA* allele, and the other retained the ancestral allele. We isolated two clones of each class from this sample; none of them had the previously characterized *spoT* mutation (COOPER *et al.* 2003), another beneficial mutation that

arose somewhat later in the same population. We then measured fitness and DNA supercoiling for these four clones. Competitions between each clone and the ancestor were performed with sixfold replication and gave similar fitness values for all four clones with no significant variation among them (one-way ANOVA,  $F_{3,20} = 1.956$ ,  $P = 0.1531$ ). The finding that co-occurring clones that retained the ancestral *topA* allele had similar fitness to those bearing the evolved allele supports the hypothesis that clonal interference impeded the substitution of the evolved allele. Moreover, and surprisingly, all four clones had approximately the same 12% increase in supercoiling compared with the ancestor. In other words, even clones from generation 1000 without the evolved *topA* allele had an altered DNA-topology phenotype similar to those carrying that allele. Therefore, the subpopulation that retained the ancestral *topA* allele acquired some other topology-altering and fitness-enhancing mutation, although the identity of this mutation is not known at present. By showing that similar beneficial mutations arose in parallel even within the same population (as well as across many replicate populations), these data further demonstrate that DNA topology was a key target of selection in the environment of the evolution experiment.

## DISCUSSION

We describe the discovery of a new class of fitness-enhancing mutations that were substituted in evolving populations of *E. coli* during 20,000 generations in a culture environment in which cells experienced daily fluctuations between glucose abundance and depletion (LENSKI *et al.* 1991; LENSKI and TRAVISANO 1994; COOPER and LENSKI 2000; LENSKI 2004). Of 12 independent populations, 10 underwent changes in DNA topology such that the level of supercoiling was higher (more negative) than that in the ancestor. We closely examined one focal population that showed a two-step increase in the level of DNA supercoiling. Two mutations were found in candidate genes known to affect DNA topology, *topA* and *fis*. The two mutations were moved, alone and in combination, into the chromosome of the ancestor. We measured supercoiling levels as well as relative fitness in these isogenic strains and found that both mutations were beneficial and that they contributed additively to the increased DNA supercoiling (Figures 2 and 4). By using numerous clones sampled from the focal population at various time points, we showed that the *topA* mutation was substituted prior to the *fis* mutation, as was likely given its larger fitness effect (Figure 4). We also found that the substitution of the evolved *topA* allele was impeded by competition with other clones that evidently had acquired other beneficial mutations that similarly affected DNA topology. The parallel phenotypic changes across the replicate populations

as well as the spread of multiple mutations affecting DNA topology within at least the focal population demonstrate that the level of DNA supercoiling was an important target of selection during the evolution experiment.

The changes in DNA topology were assessed by measuring the distribution of topoisomers of a reporter plasmid. This method is widely used to compare superhelical density between different strains or under different environmental conditions. ZECHIEDRICH *et al.* (2000) compared the effect of inhibiting topoisomerase I and topoisomerase IV on the superhelical level of a reporter plasmid and on the “effective” supercoiling level in the cell. The latter was estimated by the level of site-specific recombination by the bacteriophage  $\lambda$  integrase (BOLES *et al.* 1990). Loss of the activity of both topoisomerases led to DNA topology changes of the reporter plasmid that reflected the supercoiling changes in the cell (ZECHIEDRICH *et al.* 2000). In another study, changes in negative supercoiling of the *E. coli* chromosome in two cell-cycle mutants, *mukB* and *seqA*, were investigated by direct measurement of the superhelicity of membrane-free nucleoids using titration of the intercalating agent ethidium bromide (WEITAO *et al.* 2000). The two mutants have opposing effects on the chromosome topology. Measurements of superhelicity for a reporter plasmid and for the chromosome using ethidium bromide titration showed the same qualitative effects of the mutations, with the magnitude of the effects measured for the chromosome somewhat greater than that measured with the plasmid (WEITAO *et al.* 2000). These results therefore strongly support the interpretation that the DNA topology changes detected using a reporter plasmid qualitatively reflect what is happening *in vivo* for the chromosome.

Beneficial mutations play a central role in evolution, but they are only a tiny fraction of all mutations (FISHER 1930; KIMURA 1983) and are therefore difficult to identify and investigate. Evolution experiments with bacteria and other microorganisms offer the opportunity to study the adaptive process in the laboratory (ELENA and LENSKI 2003). Even so, sequencing dozens of 500-bp regions chosen at random after 20,000 generations in the long-term evolution experiment with *E. coli* revealed almost no mutations (LENSKI *et al.* 2003). By contrast, parallel phenotypic changes in the replicate evolving population clones led to the discovery of two loci (*rbs* and *spoT*) in which beneficial mutations occurred in most or all of the populations (COOPER *et al.* 2001a, 2003). Here, we discovered parallel changes in DNA topology, and we used this information to identify two loci, *topA* and *fis*, that acquired beneficial mutations in a focal population.

The *topA* mutation replaced the histidine at position 33, which is a conserved polar residue (CHEN and WANG 1998), with a tyrosine. Although it was previously shown that an H33A mutant topoisomerase I is unaffected in its relaxation catalytic activity (CHEN and WANG 1998),



our data indicate that the H33Y mutant protein causes an increase in DNA supercoiling, probably reflecting a conformational change. Moreover, the H33 residue lies in domain I in the structure of the 67K N-terminal fragment of topoisomerase I (LIMA *et al.* 1994) and, together with other conserved residues, it surrounds the core of residues that cluster around the active-site tyrosine. Domain I resembles a nucleotide-binding domain and may interact with one end of the cut DNA (LIMA *et al.* 1994). Our H33Y mutant probably retains some activity because complete inactivation of *topA* is lethal unless compensatory mutations in the *gyrAB* genes decrease supercoiling (DINARDO *et al.* 1982; PRUSS *et al.* 1982), and we found no such compensatory mutations. The *fis* mutation lies 4 bases upstream of the ATG translational start codon, and it reduced the level of Fis protein (Figure 3). Fis represses transcription of *gyrAB* and reduces the activity of DNA gyrase (SCHNEIDER *et al.* 1999), which may explain the increased level of supercoiling caused by the evolved *fis* allele. We have also found mutations in *topA*, *fis*, or both in some other evolved populations in addition to the focal population (D. SCHNEIDER, C. L. WINKWORTH, E. CROZAT, H. GEISELMANN, M. A. RILEY and R. E. LENSKE, unpublished data). A full survey and characterization of the mutations substituted at these loci in all 12 populations is now in progress, and the identity of these other mutations may provide further insight into the molecular basis of the adaptive changes at these loci.

Why does an increase of DNA supercoiling enhance fitness of the bacteria? The exact nature of the physiological link may be difficult to decipher, because changes in DNA topology simultaneously influence the expression of many genes (JOVANOVIĆ and LEBOWITZ 1987; PRUSS and DRlica 1989; STECK *et al.* 1993; GMUENDER *et al.* 2001). One interesting possibility is that transcription initiation from the promoters synthesizing stable RNAs is highly dependent on the level of DNA supercoiling (OOSTRA *et al.* 1981; FREE and DORMAN 1994; FIGUEROA-BOSSI *et al.* 1998). An increase in supercoiling would facilitate transcription of the rRNA operons. A higher rate of rRNA synthesis could be advantageous because the evolved lines have substantially higher exponential growth rates than does the ancestor (VASI *et al.* 1994; COOPER *et al.* 2001b). Cells growing faster may need more rRNA than cells growing slowly, and the ratio of RNA to DNA appears to have increased in the evolved lines (LENSKE *et al.* 1998). A seemingly contradictory result to that hypothesis is the observed decline in the level of Fis, which activates rRNA transcription (ROSS *et al.* 1990). However, the loss of *fis* *in vivo* has no obvious effect on transcriptional activity of rRNA operons, owing to a compensatory mechanism (ROSS *et al.* 1990), which has been suggested to involve an increase in the superhelical density of the DNA after *fis* mutation (AUNER *et al.* 2003).

In addition to *topA* and *fis* mutations that were substi-

tuted in the focal population, another mutation that increased DNA supercoiling also reached high frequency but was eventually lost. This mutation was discovered by examining the time course of the spread of the *topA* mutation, which became "stuck" at a frequency of ~50% from 500 to 1000 generations, despite its large selective advantage measured in direct competition between isogenic strains. This dynamic suggested clonal interference (GERRISH and LENSKE 1998), which was confirmed by finding that co-occurring clones from generation 1000 that lacked the evolved *topA* allele nonetheless had similarly high fitness. Moreover, these co-occurring clones had increased DNA supercoiling, indicating that they, too, carried a mutation affecting some topology-related gene. The identity of that other mutation is not known, and it was presumably eventually out-competed as additional beneficial mutations arose in the subpopulation carrying the beneficial evolved *topA* allele. All these results show that DNA supercoiling was a very important aspect of fitness in the focal population, providing one of the earliest and largest adaptive changes.

The identification of *topA* and *fis* mutations gives a total of four confirmed beneficial mutations that were substituted in the focal population Ara-1, with the others being a deletion of the *rbs* operon (COOPER *et al.* 2001a) and a point mutation in *spoT* (COOPER *et al.* 2003). Assuming that the measured fitness effects of these four mutations were additive, they would collectively increase fitness by ~28%, which is still well below the overall improvement of ~67% measured after 20,000 generations (Figure 4; COOPER and LENSKE 2000). Evidently, some beneficial mutations remain to be discovered, which is consistent with the estimate that each evolved population would have substituted between 10 and 20 beneficial mutations (LENSKE 2004). The eventual identification of all the beneficial mutations will allow the reconstruction of the entire adaptive evolutionary history of this focal population by successively introducing the various beneficial mutations into the ancestral background.

We thank Akira Ishihama (Nippon Institute for Biological Science) and Michael Cashel (National Institutes of Health) for the generous gifts of anti-Fis and anti-RpoA antibodies, respectively. We thank M. Cashel for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the French Centre National de Recherche Scientifique, Rhône-Alpes Region, and Université Joseph Fourier and from the National Science Foundation (to R.E.L.).

## LITERATURE CITED

- AUNER, H., M. BUCKLE, A. DEUFEL, T. KUTATELADZE, L. LAZARUS *et al.*, 2003 Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *J. Mol. Biol.* **331**: 331–344.
- BALKE, V. L., and J. D. GRALLA, 1987 Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4499–4506.
- BHRIAIN, N. N., C. J. DORMAN and C. F. HIGGINS, 1989 An overlap



- between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **3**: 933–942.
- BLISKA, J. B., and N. R. COZZARELLI, 1987 Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **194**: 205–218.
- BLOMFIELD, I. C., V. VAUGHN, R. F. REST and B. I. EISENSTEIN, 1991 Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* **5**: 1447–1457.
- BOLES, T. C., J. H. WHITE and N. R. COZZARELLI, 1990 Structure of plectonemically supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **213**: 931–951.
- BULL, J. J., M. R. BADGETT, H. A. WICHMAN, J. P. HUELSENBECK, D. M. HILLIS *et al.*, 1997 Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics* **147**: 1497–1507.
- CHAMPOUX, J. J., 2001 DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 369–413.
- CHEN, S.-J., and J. C. WANG, 1998 Identification of active site residues in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **273**: 6050–6056.
- COOPER, T. F., D. E. ROZEN and R. E. LENSKI, 2003 Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1072–1077.
- COOPER, V. S., and R. E. LENSKI, 2000 The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature* **407**: 736–739.
- COOPER, V. S., D. SCHNEIDER, M. BLOT and R. E. LENSKI, 2001a Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 2834–2841.
- COOPER, V. S., A. F. BENNETT and R. E. LENSKI, 2001b Evolution of thermal dependence of growth rate of *Escherichia coli* populations during 20,000 generations in a constant environment. *Evolution* **55**: 889–896.
- DI NARDO, S., K. A. VOELKEL, R. STERNGLANZ, A. E. REYNOLDS and A. WRIGHT, 1982 *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* **31**: 43–51.
- DORMAN, C. J., and P. DEIGHAN, 2003 Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 179–184.
- ELENA, S. F., and R. E. LENSKI, 2003 Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nat. Rev. Genet.* **4**: 457–469.
- FIGUEROA-BOSSI, N., M. GUÉRIN, R. RAHMOUNI, M. LENG and L. BOSSI, 1998 The supercoiling sensitivity of a bacterial tRNA promoter parallels its responsiveness to stringent control. *EMBO J.* **17**: 2359–2367.
- FISHER, R. A., 1930 *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford University Press, Oxford.
- FREE, A., and C. J. DORMAN, 1994 *Escherichia coli* *tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol. Microbiol.* **14**: 151–161.
- GELLERT, M., K. MIZUCHI, M. H. O'DEA and H. A. NASH, 1976 DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 3872–3876.
- GERRISH, P. J., and R. E. LENSKI, 1998 The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* **102/103**: 127–144.
- GMUENDER, H., K. KURATLI, K. DI PADOVA, C. P. GRAY, W. KECK *et al.*, 2001 Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res.* **11**: 28–42.
- GOLDSTEIN, E., and K. DRLICA, 1984 Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4046–4050.
- HATFIELD, G. W., and C. J. BENHAM, 2002 DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 175–203.
- HIGGINS, C. F., C. J. DORMAN, D. A. STIRLING, L. WADDELL, I. R. BOOTH *et al.*, 1988 A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Cell* **52**: 569–584.
- JOVANOVICH, S. B., and J. LEBOWITZ, 1987 Estimation of the effect of coumermycin A1 on *Salmonella typhimurium* promoters by using random operon fusions. *J. Bacteriol.* **169**: 4431–4435.
- KAREM, K., and J. W. FOSTER, 1993 The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **10**: 75–86.
- KIMURA, M., 1983 *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- LENSKI, R. E., 2004 Phenotypic and genomic evolution during a 20,000-generation experiment with the bacterium *Escherichia coli*. *Plant Breed. Rev.* **24**: 225–265.
- LENSKI, R. E., and M. TRAVISANO, 1994 Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6808–6814.
- LENSKI, R. E., M. R. ROSE, S. C. SIMPSON and S. C. TADLER, 1991 Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *Am. Nat.* **138**: 1315–1341.
- LENSKI, R. E., J. A. MONGOLD, P. D. SNIEGOWSKI, M. TRAVISANO, F. VASI *et al.*, 1998 Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: What makes one genotype a better competitor than another? *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 35–47.
- LENSKI, R. E., C. L. WINKWORTH and M. A. RILEY, 2003 Rates of DNA sequence evolution in experimental populations of *Escherichia coli* during 20,000 generations. *J. Mol. Evol.* **56**: 498–508.
- LILLEY, D. M. J., 1986 Bacterial chromatin. A new twist to an old story. *Nature* **320**: 14–15.
- LIMA, C. D., J. C. WANG and A. MONDRAGON, 1994 Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* **367**: 138–146.
- LINK, A. J., D. PHILLIPS and G. M. CHURCH, 1997 Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**: 6228–6237.
- MALLIK, P., T. S. PRATT, M. B. BEACH, M. D. BRADLEY, J. UNDRAMATLA *et al.*, 2004 Growth phase-dependent regulation and stringent control of *fis* are conserved processes in enteric bacteria and involve a single promoter (*fis P*) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**: 122–135.
- NOSIL, P., B. J. CRESPI and C. P. SANDOVAL, 2002 Host-plant adaptation drives the parallel evolution of reproductive isolation. *Nature* **417**: 440–443.
- OOSTRA, B. A., A. J. VAN VLIET, G. AB and M. GRUBER, 1981 Enhancement of ribosomal ribonucleic acid synthesis by deoxyribonucleic acid gyrase activity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **148**: 782–787.
- PAPADOPOULOS, D., D. SCHNEIDER, J. MEIER-EISS, W. ARBER, R. E. LENSKI *et al.*, 1999 Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3807–3812.
- PRUSS, G. J., and K. DRLICA, 1989 DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**: 521–523.
- PRUSS, G. J., S. H. MANES and K. DRLICA, 1982 *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* **31**: 35–42.
- REYES-DOMINGUEZ, Y., G. CONTRERAS-FERRAT, J. RAMIREZ-SANTOS, J. MEMBRILLO-HERNANDEZ and M. C. GOMEZ-EICHELMANN, 2003 Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* **185**: 1097–1100.
- ROSS, W., J. F. THOMPSON, J. T. NEWLANDS and R. L. GOURSE, 1990 *Escherichia coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *EMBO J.* **9**: 3733–3742.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
- SCHNEIDER, D., E. DUPERCHY, E. COURSENGE, R. E. LENSKI and M. BLOT, 2000 Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* **156**: 477–488.
- SCHNEIDER, R., A. TRAVERS, T. KUTATELADZE and G. MUSKHELISHVILI, 1999 A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**: 953–964.
- SNIEGOWSKI, P. D., P. J. GERRISH and R. E. LENSKI, 1997 Evolution of high mutation rates in experimental populations of *Escherichia coli*. *Nature* **387**: 703–705.
- STECK, T. R., R. J. FRANCO, J. Y. WANG and K. DRLICA, 1993 Topo-

- isomerase mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol. Microbiol.* **10**: 473–481.
- VASI, F., M. TRAVISANO and R. E. LENSKE, 1994 Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. II. Changes in life-history traits during adaptation to a seasonal environment. *Am. Nat.* **144**: 432–456.
- WANG, J. C., 1971 Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein omega. *J. Mol. Biol.* **55**: 523–533.
- WEINSTEIN-FISCHER, D., M. ELGRABLY-WEISS and S. ALTUVIA, 2000 *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol. Microbiol.* **35**: 1413–1420.
- WEITAO, T., K. NORDSTRÖM and S. DASGUPTA, 2000 *Escherichia coli* cell cycle control genes affect chromosome superhelicity. *EMBO Rep.* **1**: 494–499.
- YANISCH-PERRON, C., J. VIEIRA and J. MESSING, 1985 Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103–119.
- ZECHIEDRICH, E. L., A. B. KHODURSKY, S. BACHELLIER, R. SCHNEIDER, D. CHEN *et al.*, 2000 Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 8103–8113.

Communicating editor: G. R. SMITH

## Discussion générale

---

Douze populations indépendantes d'*E. coli*, dérivant d'un ancêtre commun, ont été propagées pendant plus de 40 000 générations par dilutions quotidiennes dans un milieu minimum contenant une quantité limitante de glucose comme seule source de carbone (Lenski *et al.*, 1991, Lenski et Travisano, 1994). Tous les jours depuis le début de cette expérience (1988), les 12 populations rencontrent une phase de latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle qui se prolonge jusqu'à l'épuisement des ressources carbonées. Les populations entrent alors en phase stationnaire, jusqu'à la dilution suivante dans du milieu frais.

Après 20 000 générations d'évolution expérimentale, les 12 populations présentent une augmentation moyenne de fitness de 70% par rapport à l'ancêtre, la majeure partie du gain de fitness étant observée avant 2000 générations (Lenski et Travisano, 1994, Cooper et Lenski, 2000). Ceci démontre l'adaptation des bactéries aux conditions de croissance. Pour comprendre les mécanismes à la base de cette adaptation, il est nécessaire d'identifier les mutations apportant un avantage sélectif et de caractériser leurs effets phénotypiques et moléculaires. Mes travaux de thèse se placent dans le cadre de ces deux objectifs. D'une part, mes travaux ont permis d'identifier un certain nombre de mutations bénéfiques dans les populations d'évolution expérimentale. Elles ciblent l'opéron *pbpA-rodA*, impliqué dans la synthèse de peptidoglycane au cours de l'élongation de la paroi, et les gènes *topA*, codant la topoisomérase I, et *fis*, codant la protéine Fis associée au nucléoïde, impliqués dans la régulation de la superhélicité du chromosome. D'autre part, un certain nombre de ces mutations (*pbpA-rodA*), ainsi que d'autres mutations mises en évidence antérieurement (*spoT*, Cooper *et al.*, 2003), ont été caractérisées aux niveaux phénotypique et moléculaire au cours de ce travail.

### I. Le parallélisme de l'évolution

L'évolution des 12 populations se caractérise par des changements phénotypiques parallèles. Le fitness ainsi que le volume cellulaire augmentent de façon parallèle dans les 12 populations au cours de l'évolution (Lenski et Travisano, 1994, Cooper et Lenski, 2000, Lenski, 2000). Les populations évoluées tendent à se spécialiser pour l'utilisation du glucose et leurs capacités à utiliser un certain nombre d'autres sources de carbone (maltose, ribose...) est réduite (Cooper et Lenski, 2000, Cooper *et al.*, 2001, Pelosi *et al.*, 2006). D'autre part,

l'expression de nombreux gènes est modifiée de façon parallèle dans les populations évoluées par rapport à l'ancêtre (Cooper *et al.*, 2003, Pelosi *et al.*, 2006). Au cours de ce travail, nous avons également mis en évidence une augmentation parallèle de la superhélicité du chromosome dans les populations évoluées par rapport à l'ancêtre (Crozat *et al.*, 2005). L'étude de ces phénotypes modifiés de façon reproductible a permis d'identifier des mutations impliquées dans l'adaptation des bactéries à leur environnement. Ces mutations ciblent notamment l'opéron *rbs*, impliqué dans l'utilisation du ribose (Cooper *et al.*, 2001), le gène *malT*, codant un régulateur de l'expression des gènes d'utilisation du maltose (Pelosi *et al.*, 2006), et le gène *spoT*, codant la protéine SpoT, un acteur majeur du métabolisme de (p)ppGpp, l'effecteur de la réponse stringente (Cooper *et al.*, 2003). Les changements parallèles de topologie de l'ADN nous ont permis d'identifier des mutations dans les gènes *topA* et *fis* dans la population Ara-1 (Crozat *et al.*, 2005). Ces deux mutations ont été introduites, seules et en combinaison, dans le contexte génétique ancestral et leurs effets moléculaires et phénotypiques ont été étudiés. Ceci a permis de démontrer qu'elles apportent un avantage sélectif important (*topA* : 13%, *fis* : 3%) et sont responsables de tous les changements de superhélicité observés dans la population Ara-1 à 20 000 générations (Crozat *et al.*, 2005).

Les gènes *rbs*, *spoT*, *malT*, *fis* et *topA*, pour lesquels des mutations ont été mises en évidence dans les populations Ara-1 et/ou Ara+1, ont été séquencés dans toutes les populations. Ceci a permis de mettre en évidence un parallélisme important de l'évolution au niveau génétique, à l'origine du parallélisme phénotypique observé. En effet, tous ces gènes sont ciblés par des mutations dans plusieurs voire la totalité des populations (Cooper *et al.*, 2001, Cooper *et al.*, 2003, Pelosi *et al.*, 2006, Estelle Crozat, résultats non publiés). D'autres mutations ont également été identifiées par l'analyse des transpositions d'éléments IS au cours de l'évolution au sein des populations Ara-1 et Ara+1 (Papadopoulos *et al.*, 1999, Schneider *et al.*, 2000). Ces mutations ciblent les gènes *pykF*, codant la pyruvate kinase I, *nadR*, codant le répresseur de biosynthèse du NAD, *hokB-sokB*, homologue à un système de maintien de plasmide et codant un système toxine-antitoxine, et l'opéron *pbpA-rodA*, impliqué dans la biosynthèse du peptidoglycane (Schneider *et al.*, 2000). Ces gènes ont également été séquencés dans toutes les populations, révélant une fois de plus un degré élevé de parallélisme génétique, puisque ces gènes sont mutés dans de nombreuses populations (Woods *et al.*, 2006). Ces résultats sont en contraste important avec le séquençage aléatoire de 36 gènes chez les 12 populations qui n'a révélé qu'une dizaine de mutations et uniquement chez les populations mutatrices (Lenski *et al.*, 2003). Alors que le nombre de mutations est

estimé à plus d'un milliard dans chaque population au cours des 40 000 générations d'évolution expérimentale, les mutations bénéfiques fixées au sein des populations sont donc relativement rares et difficiles à mettre en évidence. Le séquençage complet du génome d'un clone isolé de la population Ara-1 à 40 000 générations n'a ainsi révélé qu'une trentaine de mutations par rapport à l'ancêtre (résultats non publiés). Il est donc probable que les mutations ciblant de façon parallèle les mêmes gènes au sein de plusieurs populations apportent un bénéfice. L'étude de mutations sélectionnées dans l'opéron *pbpA-rodA* au cours de ce travail a permis de confirmer cette hypothèse. Des souches isogéniques portant les allèles *pbpA* ancestral ou évolués des populations Ara+1 et Ara-5 ont été construites au moyen du plasmide suicide pKO3. L'effet des mutations sur le fitness a été étudié par des expériences de compétitions entre ces souches. Ceci a permis de révéler un effet bénéfique de 7% et 4,4% des mutations *pbpA*<sup>+1</sup> et *pbpA*<sup>-5</sup> respectivement sur l'adaptation des populations aux conditions de l'évolution expérimentale.

La sélection naturelle cible donc les mêmes gènes dans les 12 populations au cours de l'évolution expérimentale. Cependant, ces mutations sont différentes d'une population à l'autre (Woods *et al.*, 2006, Cooper *et al.*, 2003, Cooper *et al.*, 2001, Pelosi *et al.*, 2006). Les effets phénotypiques et moléculaires des mutations *pbpA-rodA* des populations Ara+1 et Ara-5 ainsi que des mutations *spoT* des populations Ara-1, Ara+2 et Ara-4 ont été étudiés au cours de ce travail. Bien qu'elles ne soient pas identiques au niveau nucléotidique, les mutations ciblant chaque gène ont des conséquences similaires. Outre une augmentation de fitness, les mutations mises en évidence dans l'opéron *pbpA-rodA* entraînent une diminution de l'expression de la protéine PBP2, responsable d'un changement de morphologie des cellules. Les mutations du gène *spoT* entraînent quant à elles également une augmentation importante du fitness, en moyenne égale à 10%, ainsi qu'une diminution moins importante du contenu intracellulaire en ADN, ARN et protéines en phase stationnaire. Ainsi, l'évolution génétique parallèle observée au sein des 12 populations est à l'origine d'un parallélisme moléculaire.

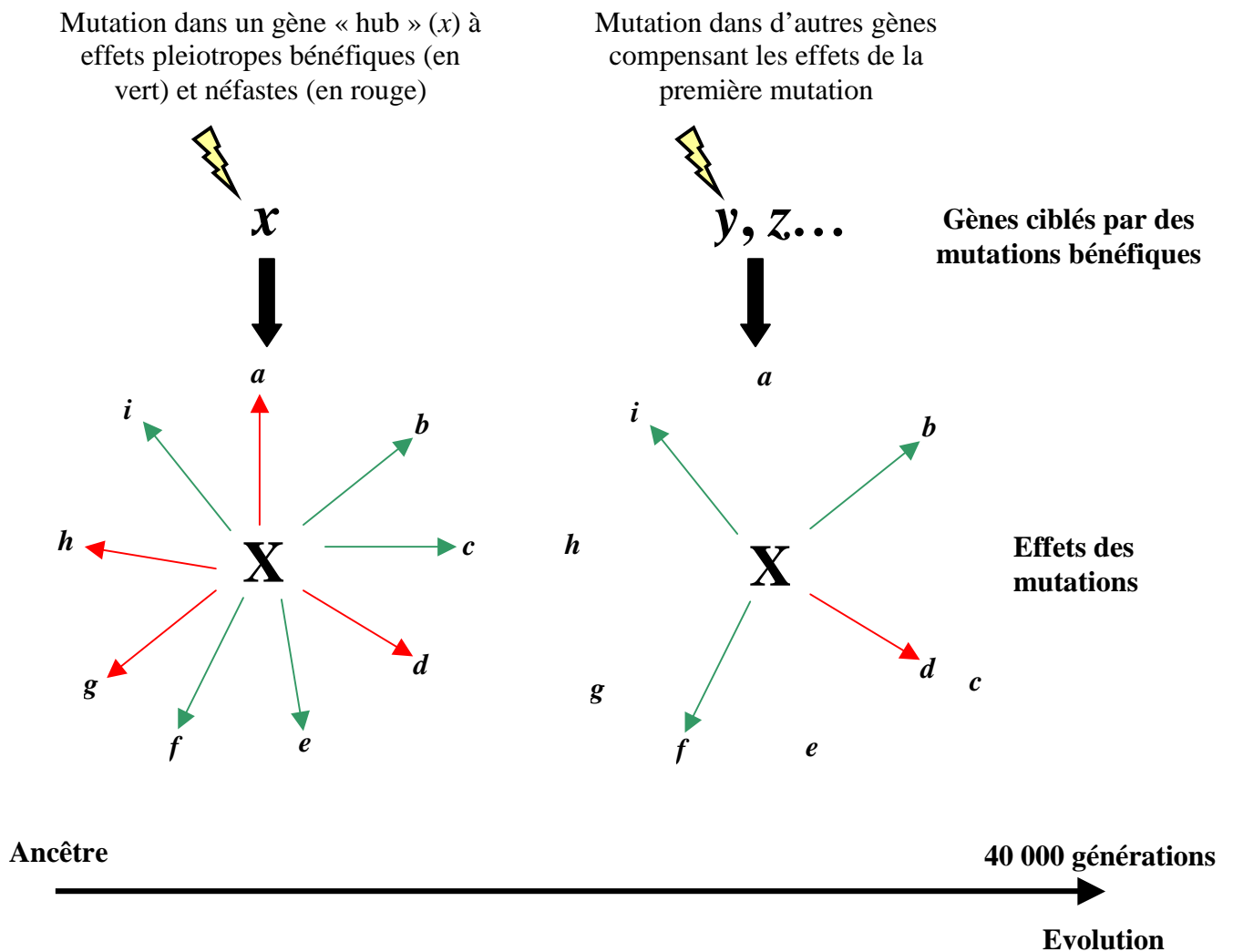
Notre stratégie d'évolution expérimentale montre que l'adaptation d'*E. coli* se caractérise par un degré important de parallélisme phénotypique, génétique et moléculaire. Ceci a également été observé dans de nombreuses autres études utilisant des conditions environnementales et des organismes différents. Une étude réalisée sur 18 populations indépendantes de *Ralstonia sp.* évoluant dans un environnement contenant du 2,4D (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique) comme seule source de carbone montre une augmentation de fitness importante et parallèle. L'évolution de ces 18 populations se caractérise par une duplication des mêmes gènes impliqués dans l'utilisation du 2,4D (Nakatsu *et al.*, 1998).

L'étude de l'évolution de souches pathogènes d'*E. coli* montre que les anciennes lignées d'*E. coli* ont acquis les mêmes facteurs de virulence de façon indépendante et parallèle, incluant un îlot de pathogénicité impliqué dans l'adhésion intestinale ainsi que des gènes de toxines et d'hémolysine (Reid *et al.*, 2000). L'étude de l'évolution de plusieurs lignées du bactériophage  $\Phi$ X174 adaptées à une température élevée révèle une augmentation de fitness parallèle à une augmentation du nombre de mutations. De nombreuses mutations sont fixées de façon indépendante dans plusieurs lignées, ces mutations étant bien souvent tout à fait identiques (Bull *et al.*, 1997). Chez ce bactériophage, le niveau de parallélisme est donc encore plus important que dans notre stratégie d'évolution expérimentale.

Chez les eucaryotes, l'étude de la morphologie de larves d'insectes montre une évolution convergente de la même voie de développement chez différents organismes. Une perte de trichomes est observée de façon indépendante chez *Drosophila melanogaster* et plusieurs espèces du groupe *Drosophila virilis*. Ce parallélisme morphologique est dû à des changements de régulation du même gène régulateur de développement : *shavenbaby/ovo* (Sucena *et al.*, 2003). Une telle évolution phénotypique parallèle est également observée chez les poissons cichlides est-africains, vivant dans deux lacs séparés, dont les pigments rétinien ont évolué pour permettre l'adaptation des individus aux eaux profondes. Cette évolution a la même origine génétique puisque le même nucléotide du même gène est touché indépendamment dans de nombreux individus d'espèces différentes, entraînant des changements fonctionnels similaires (Sugawara *et al.*, 2005). Tous ces exemples suggèrent une adaptation par des modifications indépendantes et parallèles de l'expression de certains gènes à l'origine d'un parallélisme phénotypique important.

## II. La plasticité des réseaux de régulation

Les mutations à l'origine des changements adaptatifs observés dans les 12 populations touchent à la fois des gènes codant des protéines impliquées dans un petit nombre de fonctions enzymatiques (*pykF*, *pbpA-rodA*, *rbs*, *hokB-sokB*...), et des gènes codant des régulateurs de l'expression d'autres gènes (*fis*, *spoT*, *malT*, *topA*, *nadR*). Dans ce dernier cas, cela concerne à la fois des régulateurs d'un nombre limité de gènes, tel que MalT, mais également des régulateurs de l'expression globale des gènes (Topo I, Fis, SpoT), impliqués dans des réseaux de régulation complexes comme la superhélicité de l'ADN et la réponse stringente. Notre stratégie d'évolution expérimentale est donc également caractérisée par une évolution de tous les niveaux de régulation dans la cellule, du plus simple au plus complexe.



**Figure 56 : Mécanismes moléculaires adaptatifs.** L'évolution et l'adaptation des organismes à leur environnement se caractérise par la sélection rapide de mutations bénéfiques ayant des effets pleiotropes drastiques, bénéfiques (en vert) et neutre ou faiblement néfastes (en rouge) (les gènes cibles sont symbolisés par des lettres allant de  $a$  à  $i$ ). L'effet bénéfique de ces mutations représente donc la somme de tous ces effets. A la suite de ces mutations, une compensation des effets des premières mutations pourrait être observée, grâce à l'apparition d'autres mutations. Lorsque celles-ci compensent les effets néfastes des premières mutations, elles apportent alors un avantage sélectif et améliorent le fitness des bactéries, leur permettant ainsi de se rapprocher de l'optimum de fitness.

**La plasticité des réseaux de régulation est donc un paramètre crucial permettant l'adaptation des bactéries à leur environnement.**

Des modifications sont observées dans les deux réseaux les plus importants permettant la détection de stress et carences et provoquant une réponse adaptée de l'organisme par ajustement de l'expression des gènes : la réponse stringente et la topologie de l'ADN. L'évolution observée reflète l'architecture et la complexité des réseaux de régulation dans la cellule (Ma *et al.*, 2004, Shen-Orr *et al.*, 2002). En effet, ceux-ci sont constitués d'un grand nombre de gènes peu connectés et d'un petit nombre de gènes très fortement connectés et régulant l'expression d'un nombre élevé de gènes cibles. Ces derniers constituent des pivots de régulation ou « hubs ». Nous aurions pu nous attendre à ce que les gènes hubs ne soient pas ou peu modifiés au cours de cette évolution, puisque leurs modifications ont des effets pleiotropes. Or, près de la moitié des mutations bénéfiques mises en évidence affectent des gènes hubs (*spoT*, *topA*, *fis*) qui, de plus, sont souvent les premières cibles touchées au cours de l'évolution expérimentale. Les mutations bénéfiques touchant les hubs ont forcément des effets pleiotropes et il est difficile d'imaginer que tous ces effets soient bénéfiques. Certains sont probablement neutres, voire faiblement néfastes, mais contre-balancés par des effets bénéfiques plus importants. Il est donc probable que les gènes hubs touchés lors des premières étapes de l'évolution aient eu des effets pleiotropes drastiques, dont ceux qui étaient faiblement néfastes ont ensuite été corrigés par l'apparition d'autres mutations bénéfiques, fixées plus tard au cours de l'évolution. Ces dernières apporteraient alors un avantage en corrigeant les effets néfastes des premières (Fig.56). Ceci pourrait être le cas de la mutation *spoT* de la population Ara-1 qui modifie l'expression de 341 gènes lorsqu'elle est introduite dans le génome de l'ancêtre. A 2000 générations, seuls 64 de ces changements de transcription sont conservés par rapport à l'ancêtre. Les mutations apparues après la mutation *spoT* et avant 2000 générations pourraient donc corriger des effets néfastes de la mutation *spoT*. Ce phénomène a d'ailleurs été observé dans une autre étude d'évolution expérimentale au cours de laquelle 7 populations indépendantes ont été adaptées à deux conditions différentes : du milieu minimum contenant du glycérol ou du lactate comme seule source de carbone pendant 600 à 1000 générations, à partir d'une souche d'*E. coli* K12 (Fong *et al.*, 2005). L'analyse du profil de transcription de ces 14 populations au cours de l'évolution révèle que l'expression de nombreux gènes est modifiée en début d'expérience en réponse aux nouvelles conditions de croissance. Ceci est rapidement suivi d'un retour de l'expression de la plupart des gènes au niveau initial (Fong *et al.*, 2005). Ainsi, un ensemble relativement restreint de gènes est exprimé différenciellement dans les clones évolués par rapport à



l'ancêtre, et un nombre important de changements compensatoires d'expression des gènes est observé au cours de l'évolution (Fong *et al.*, 2005).

D'autres études d'évolution expérimentale chez *E. coli* ont également mis en évidence des modifications d'expression de régulateurs transcriptionnels. L'adaptation d'*E. coli* à des conditions totalement différentes (cultures continues en chimostat dans un milieu limité en glucose) a révélé la sélection de mutations adaptatives dans le gène *malT*, permettant d'améliorer l'efficacité du transport du glucose via la porine LamB (Manche *et al.*, 1999). L'adaptation de souches d'*E. coli* à une phase stationnaire prolongée entraîne la sélection de mutations dans des gènes codant des régulateurs globaux tels que Lrp, intervenant lors de carences en acides aminés (Zinser et Kolter, 2000) et RpoS, le facteur sigma de la phase stationnaire et de nombreuses conditions de stress (Farrell et Finkel, 2003). Ces mutations améliorent la capacité des bactéries à utiliser les acides aminés libérés lors de la lyse d'une partie de la population et confèrent donc un avantage de croissance en phase stationnaire (GASP) (Zinser et Kolter, 2000, Finkel, 2006). D'autre part, l'adaptation de *Pseudomonas fluorescens* à une culture statique se caractérise par l'apparition de populations phénotypiquement différentes qui colonisent des niches écologiques distinctes (interface air-liquide, fond anaérobie du liquide, milieu microaérobie du microcosme) (Rainey et Travisano, 1998). Bien que les mutations bénéfiques responsables de cette adaptation n'aient pas été clairement identifiées, il est probable qu'elles touchent des gènes de régulateurs globaux. En effet, la population colonisant l'interface air-liquide est caractérisée par une production importante d'un polymère de type cellulose, favorisant la formation de biofilms à la surface du liquide (Spiers *et al.*, 2002). Aucune mutation n'a été identifiée dans les gènes de structure connus pour être impliqués dans la formation de ce polymère (Spiers *et al.*, 2002).

Le fait que les réseaux de régulation et leur plasticité confèrent des capacités évolutives est également visible par leur polymorphisme dans certains isolats naturels. L'étude de 41 isolats cliniques de *Salmonella* sérotype Typhi montre que 15 isolats présentent des mutations de types insertions, délétions et mutations non-sens, dans le gène *rpoS*, codant le facteur sigma S requis pour la virulence chez la souris (Robbe-Saule *et al.*, 2003). Ce régulateur est également très variable selon les isolats d'*E. coli* (King *et al.*, 2004, Robey *et al.*, 2001). Les isolats naturels d'*E. coli* O157 : H7 présentent une variation de l'activité de RpoS corrélée avec des différences de résistance à la pression osmotique (Robey *et al.*, 2001). Cette activité variable de RpoS peut s'expliquer par un polymorphisme du gène *rpoS* (Robey *et al.*, 2001). Les isolats de laboratoire et naturels d'*E. coli* présentent des niveaux différents des facteurs sigmas RpoS et RpoD, ce qui affecte la transcription globale, résultant en une

variabilité des capacités métaboliques et de la résistance à divers stress (King *et al.*, 2004). En effet, ces deux facteurs sigmas entrent en compétition pour la liaison à l'ARN polymérase. Une faible concentration de RpoS favoriserait la liaison de RpoD à l'ARN polymérase, ce qui améliorerait la croissance. A l'inverse, une concentration élevée de RpoS favoriserait la résistance aux stress (King *et al.*, 2004). La modification de ce réseau de régulation majeur dont le pivot est RpoS permet donc l'adaptation à des environnements différents. L'hétérogénéité de nombreuses propriétés, *a priori* non liées, dans les isolats d'*E. coli*, telles que le taux de mutations (Tenaillon *et al.*, 2004), les gènes de virulence (Hacker *et al.*, 2003), les capacités métaboliques (Durso *et al.*, 2004, King *et al.*, 2004), suggère que les systèmes régulateurs sont soumis à des sélections qui les diversifient probablement de façon plus importante que les gènes de structure. Récemment, il a été démontré qu'une population d'*E. coli* en culture continue pouvait évoluer selon différentes stratégies, différant notamment par l'expression des régulateurs transcriptionnels majeurs (Maharjan *et al.*, 2006). Ainsi, cette population clonale a entraîné l'émergence de 5 clusters phénotypiques caractérisés par des variations de régulation globale (RpoS, niveaux de (p)ppGpp) et de capacités métaboliques (Maharjan *et al.*, 2006). Selon cette étude, des modifications de la réponse stringente pourraient donc permettre l'adaptation des bactéries à leur environnement.

La complexité et la plasticité des réseaux de régulation pourraient ainsi avoir été sélectionnées au cours de l'évolution, de par leur capacité à accroître le spectre évolutif des organismes vivants. Selon cette hypothèse, elles constitueraient donc un phénotype supplémentaire révélant une évolution parallèle au sein des 12 populations d'évolution expérimentale.

### **III. Les mécanismes moléculaires de l'adaptation**

Au cours de l'évolution expérimentale, deux catégories de mutations adaptatives ont donc été sélectionnées. D'une part, certaines mutations touchent des gènes de structure ou codant des régulateurs d'un petit nombre de gènes. Celles-ci entraînent des phénotypes relativement clairs et évidents. Les mutations *malT* entraînent une diminution de la capacité des bactéries à utiliser le maltose comme source de carbone (Pelosi *et al.*, 2006), de la même façon que les mutations de l'opéron *rbs* provoquent une perte de la capacité à utiliser le ribose (Cooper *et al.*, 2001). Au cours de ce travail, nous avons pu montrer que les mutations de l'opéron *pbpA-rodA* entraînent une reprogrammation de la synthèse de peptidoglycane en

faveur de la synthèse au niveau du septum, plutôt que le long du bâtonnet. Ceci pourrait favoriser la croissance et la division cellulaire.

D'autre part, certaines mutations touchent des gènes « hubs », impliqués dans deux réseaux de régulation majeurs permettant l'adaptation des bactéries à divers stress et carences : la réponse stringente et la topologie de l'ADN. Les mutations touchant ces réseaux (Crozat *et al.*, 2005, Cooper *et al.*, 2003) ont des effets pleiotropes et entraînent des phénotypes plutôt subtils et complexes. Il semblerait que ces mutations favorisent la croissance bactérienne dans nos conditions d'évolution expérimentale.

La réponse stringente et la topologie de l'ADN constituent deux réseaux de régulation globale majeurs impliqués dans l'adaptation des bactéries aux transitions nutritionnelles comme en rencontrent tous les jours les 12 populations depuis le début de l'évolution. Les mutations adaptatives ciblant ces deux réseaux au cours de l'évolution entraînent une augmentation de superhélicité négative de l'ADN et un relâchement du contrôle stringente lors du passage en phase stationnaire (Crozat *et al.*, 2005, Cooper *et al.*, 2003, ce travail). Une superhélicité négative élevée est caractéristique de la phase de croissance exponentielle (Drlica, 1992). Elle permet notamment de surmonter la barrière énergétique constituée par le discriminateur au niveau de l'initiation de la transcription des promoteurs stringents, c'est-à-dire régulés négativement par (p)ppGpp et nécessaires à la croissance, comme c'est le cas des promoteurs d'opérons d'ARN stables. Une superhélicité négative élevée pourrait donc favoriser leur transcription, et par conséquent la croissance des bactéries (Auner *et al.*, 2003, Schneider *et al.*, 2000, Travers et Muskhelishvili, 2005, Lamond, 1985, Ohlsen et Gralla, 1992, Free et Dorman, 1994). L'expression des ARN stables est également favorisée par un niveau faible de (p)ppGpp qui, par liaison à l'ARN polymérase, inhibe la transcription à partir de ces promoteurs, mais aussi la réplication de l'ADN et la synthèse protéique tout en activant la protéolyse (Cashel *et al.*, 1996, Chatterji *et al.*, 1998, Reddy *et al.*, 1995, Touloukhonov *et al.*, 2001, Arstimovitch *et al.*, 2004, Zhou et Jin, 1998). Bien que les mutations sélectionnées dans le gène *spoT* n'entraînent pas de modifications du niveau de (p)ppGpp, elles atténuent le contrôle stringente observé lors du passage des cellules de la phase exponentielle à la phase stationnaire. En effet, dans les souches portant les mutations identifiées dans le gène *spoT*, les concentrations en ADN, ARN et protéines diminuent de façon moins importante lors de la transition vers la phase stationnaire. Ce phénomène de contrôle stringente est donc relâché, et ce de façon indépendante de la concentration en (p)ppGpp. L'augmentation de superhélicité ainsi que les mutations *spoT* sélectionnées au cours de l'évolution semblent donc atténuer les transitions

entre la phase exponentielle et la phase stationnaire. Tout semble se passer comme si les cellules n'entraient pas complètement en phase stationnaire mais tendaient à conserver un état physiologique plus proche des conditions de croissance active. Les deux réseaux de régulation globale que sont la topologie de l'ADN et la réponse stringente pourraient donc être ajustés de façon subtile afin de permettre aux bactéries de s'adapter efficacement aux conditions de l'évolution expérimentale, en favorisant leur croissance.

La majorité des études génétiques effectuées jusqu'à présent consistaient à inactiver des gènes et à déterminer les effets de ces pertes de fonctions. Notre stratégie d'évolution expérimentale consiste au contraire à laisser la sélection naturelle opérer, ce qui aboutit à l'augmentation du fitness. Les mutations sélectionnées n'ont souvent pas les effets drastiques d'une délétion ou d'une inactivation, mais plutôt des effets subtils d'ajustement de fonction ou d'expression. Ce type d'étude peut ainsi permettre de mettre en évidence de nouvelles fonctions associées à certains gènes. Ainsi, jusqu'à aujourd'hui, le gène *spoT* a fait l'objet d'études grâce à des mutations situées dans le domaine N-terminal de SpoT, au niveau des domaines impliqués dans la synthèse ou la dégradation de (p)ppGpp et conduisant à des pertes de fonction (Cashel *et al.*, 1996). Les mutations sélectionnées au cours de l'évolution sont au contraire situées dans le domaine C-terminal de SpoT, dont le rôle exact est inconnu, ainsi qu'au niveau du chevauchement entre les domaines de synthèse et de dégradation de (p)ppGpp, *a priori* impliqué dans la régulation des deux activités catalytiques. Ces mutations joueraient donc plutôt un rôle dans la régulation de l'activité de la protéine SpoT. Il n'est donc pas étonnant que les mutations du gène *spoT* ne modifient pas de façon drastique le niveau de (p)ppGpp et présentent des phénotypes peu faciles à mettre en évidence et donc à étudier. De plus, cette stratégie nous aura permis de mettre en évidence de nouveaux phénotypes associés à cette protéine et d'émettre des hypothèses quant au rôle du domaine C-terminal de SpoT. Ce domaine serait notamment impliqué dans des interactions protéiques avec la protéine ACP, via les résidus acides aminés tyrosine 389 et lysine 662. Il serait également impliqué dans certains aspects du contrôle stringente et dans la transcription globale des gènes de façon indépendante du niveau de (p)ppGpp. Le domaine C-terminal de SpoT est donc impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire par un mécanisme nouveau. Il possède donc probablement des fonctions plus diverses que le contrôle des activités de synthèse ou de dégradation de (p)ppGpp.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Addinall, S.G., Bi, E., Lutkenhaus, J., 1996. FtsZ ring formation in *fts* mutants. *J. Bacteriol.* 178, 3877-3884.
- Ahlens, J., Gunther, T., 1975. Phospholipids and ATPase activity of wild-type and ATPase deficient and uncoupled mutants of *E. coli*. *Z. Naturforsch. [C.]* 30, 832-834.
- Akerlund, T., Nordstrom, K., Bernander, R., 1995. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 6791-6797.
- Aldea, M., Garrido, T., Hernandez-Chico, C., Vicente, M., Kushner, S.R., 1989. Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *E. coli* morphogene. *EMBO J.* 8, 3923-3931.
- Alfoldi, L., Stent, G.S., Clowes, R.C., 1962. The chromosomal site of the RNA control (RC) locus in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 5, 348-355.
- Ali, A.T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S., Ishihama, A., 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.* 181, 6361-6370.
- Allen, R.J., Scott, G.K., 1979. Biosynthesis and turnover of outer-membrane proteins in *Escherichia coli* ML308-225. *Biochem. J.* 182, 407-412.
- Almiron, M., Link, A.J., Furlong, D., Kolter, R., 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6, 2646-2654.
- Amsler, C.D., Cho, M., Matsumura, P., 1993. Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *J. Bacteriol.* 175, 6238-6244.
- Aono, R., Yamasaki, M., Tamura, G., 1979. High and selective resistance to mecillinam in adenylate cyclase-deficient or cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 137, 839-845.
- Arnold, G.F., Tessman, I., 1988. Regulation of DNA superhelicity by *rpoB* mutations that suppress defective Rho-mediated transcription termination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 4266-4271.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., Vassilyev, D.G., 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* 117, 299-310.
- Asoh, S., Matsuzawa, H., Ishino, F., Strominger, J.L., Matsubashi, M., Ohta, T., 1986. Nucleotide sequence of the *pbpA* gene and characteristics of the deduced amino acid sequence of penicillin-binding protein 2 of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 160, 231-238.
- Atherly, A.G., 1979. *E. coli* mutant containing a large deletion from *relA* to *argA*. *J. Bacteriol.* 138, 530-534.
- Atwood, K.C., Schneider, L.K., Ryan, F.J., 1951. Periodic selection in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 37, 146-155.
- Auner, H., Buckle, M., Deufel, A., Kutateladze, T., Lazarus, L., Mavathur, R., Muskhelishvili, G., Pemberton, I., Schneider, R., Travers, A., 2003. Mechanism of transcriptional activation by FIS: role of core promoter structure and DNA topology. *J. Mol. Biol.* 331, 331-344.
- Aviv, M., Giladi, H., Oppenheim, A.B., Glaser, G., 1996. Analysis of the shut-off of ribosomal RNA promoters in *Escherichia coli* upon entering the stationary phase of growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 71-76.
- Azam, T.A., Hiraga, S., Ishihama, A., 2000. Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* 5, 613-626.
- Azam, T.A., Ishihama, A., 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. *J. Biol. Chem.* 274, 33105-33113.
- Baaklini, I., Hraiky, C., Rallu, F., Tse-Dinh, Y.C., Drolet, M., 2004. RNase HI overproduction is required for efficient full-length RNA synthesis in the absence of topoisomerase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 54, 198-211.
- Balke, V.L., Gralla, J.D., 1987. Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 4499-4506.
- Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C., Johnson, R.C., 1992. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 8043-8056.
- Balzer, G.J., McLean, R.J., 2002. The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. *Can. J. Microbiol.* 48, 675-680.

- Barker,M.M., Gaal,T., Gourse,R.L., 2001a. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. J. Mol. Biol. 305, 689-702.
- Barker,M.M., Gaal,T., Josaitis,C.A., Gourse,R.L., 2001b. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. J. Mol. Biol. 305, 673-688.
- Bartlett,M.S., Gaal,T., Ross,W., Gourse,R.L., 1998. RNA polymerase mutants that destabilize RNA polymerase-promoter complexes alter NTP-sensing by *rrn* P1 promoters. J. Mol. Biol. 279, 331-345.
- Batchelor,E., Walthers,D., Kenney,L.J., Goulian,M., 2005. The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins *ompF* and *ompC*. J. Bacteriol. 187, 5723-5731.
- Becker,G., Klauck,E., Hengge-Aronis,R., 1999. Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96, 6439-6444.
- Beloin,C., Valle,J., Latour-Lambert,P., Faure,P., Kzreminski,M., Balestrino,D., Haagenen,J.A., Molin,S., Prensier,G., Arbeille,B., Ghigo,J.M., 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. Mol. Microbiol. 51, 659-674.
- Betzner,A.S., Ferreira,L.C., Holtje,J.V., Keck,W., 1990. Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 55, 161-164.
- Bi,E.F., Lutkenhaus,J., 1991. FtsZ ring structure associated with division in *E. coli*. Nature 354, 161-164.
- Björk G.R. 1996. Stable RNA modification. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. 861-886. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Blasco,B., Pisabarro,A.G., de Pedro,M.A., 1988. Peptidoglycan biosynthesis in stationary-phase cells of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 5224-5228.
- Bliska,J.B., Cozzarelli,N.R., 1987. Use of site-specific recombination as a probe of DNA structure and metabolism *in vivo*. J. Mol. Biol. 194, 205-218.
- Boccard,F., Esnault,E., Valens,M., 2005. Spatial arrangement and macrodomain organization of bacterial chromosomes. Mol. Microbiol. 57, 9-16.
- Bohannon,D.E., Connell,N., Keener,J., Tormo,A., Espinosa-Urgel,M., Zambrano,M.M., Kolter,R., 1991. Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of *katF* mutations and role of sigma 70. J. Bacteriol. 173, 4482-4492.
- Bokal,A.J., Ross,W., Gourse,R.L., 1995. The transcriptional activator protein FIS: DNA interactions and cooperative interactions with RNA polymerase at the *E. coli rrnB* P1 promoter. J. Mol. Biol. 245, 197-207.
- Boneca,I.G., 2005. The role of peptidoglycan in pathogenesis. Curr. Opin. Microbiol. 8, 46-53.
- Bordes,P., Conter,A., Morales,V., Bouvier,J., Kolb,A., Gutierrez,C., 2003. DNA supercoiling contributes to disconnect sigmaS accumulation from sigmaS-dependent transcription in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 48, 561-571.
- Borek,E., Rockenbach,J., Ryan,A., 1956. Studies on a mutant of *Escherichia coli* with unbalanced ribonucleic acid synthesis. J. Bacteriol. 71, 318-323.
- Botta,G.A., Buffa,D., 1981. Murein synthesis and beta-lactam antibiotic susceptibility during rod-to-sphere transition in a *pbpA*(Ts) mutant of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 19, 891-900.
- Bouvier,J., Gordia,S., Kampmann,G., Lange,R., Hengge-Aronis,R., Gutierrez,C., 1998. Interplay between global regulators of *Escherichia coli*: effect of RpoS, Lrp and H-NS on transcription of the gene *osmC*. Mol. Microbiol. 28, 971-980.
- 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.
- Braeken,K., Moris,M., Daniels,R., Vanderleyden,J., Michiels,J., 2006. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. Trends Microbiol. 14, 45-54.
- Bremer H., Dennis P. 1996. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. *E.coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. 1553-1569. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Brown,E.D., Wood,J.M., 1993. Conformational change and membrane association of the PutA protein are coincident with reduction of its FAD cofactor by proline. J. Biol. Chem. 268, 8972-8979.
- Brown,L., Elliott,T., 1996. Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. J. Bacteriol. 178, 3763-3770.
- Brown,L., Gentry,D., Elliott,T., Cashel,M., 2002. DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. J. Bacteriol. 184, 4455-4465.

- Buchanan, C.E., Sowell, M.O., 1982. Synthesis of penicillin-binding protein 6 by stationary-phase *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 151, 491-494.
- Buglino, J., Shen, V., Hakimian, P., Lima, C.D., 2002. Structural and biochemical analysis of the Obg GTP binding protein. Structure. 10, 1581-1592.
- Bull, J.J., Badgett, M.R., Wichman, H.A., Huelsenbeck, J.P., Hillis, D.M., Gulati, A., Ho, C., Molineux, I.J., 1997. Exceptional convergent evolution in a virus. Genetics 147, 1497-1507.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J., Emili, A., 2005. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. Nature 433, 531-537.
- Canepari, P., Di Stefano, C.F., Lleo, M.M., Satta, G., 1993. Peptidoglycan synthesis and its fine chemical composition in dividing and not dividing *Klebsiella pneumoniae* cocci. New Microbiol. 16, 165-170.
- Case, R.B., Chang, Y.P., Smith, S.B., Gore, J., Cozzarelli, N.R., Bustamante, C., 2004. The bacterial condensin MukBEF compacts DNA into a repetitive, stable structure. Science 305, 222-227.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Vinella, D., 1996. The stringent response. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. 1458-1496. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Cashel, M., Gallant, J., 1969. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. Nature 221, 838-841.
- Cassels, R., Oliva, B., Knowles, D., 1995. Occurrence of the regulatory nucleotides ppGpp and pppGpp following induction of the stringent response in staphylococci. J. Bacteriol. 177, 5161-5165.
- Chakraborty, R., Bibb, M., 1997. The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. J. Bacteriol. 179, 5854-5861.
- Champoux, J.J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu. Rev. Biochem. 70, 369-413.
- Chatterji, D., Fujita, N., Ishihama, A., 1998. The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Genes Cells 3, 279-287.
- Chen, S., Zhang, A., Blyn, L.B., Storz, G., 2004. MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186, 6689-6697.
- Chen, S.J., Wang, J.C., 1998. Identification of active site residues in *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. J. Biol. Chem. 273, 6050-6056.
- Cheung, K.J., Badarinarayana, V., Selinger, D.W., Janse, D., Church, G.M., 2003. A microarray-based antibiotic screen identifies a regulatory role for supercoiling in the osmotic stress response of *Escherichia coli*. Genome Res. 13, 206-215.
- Chiaramello, A.E., Zyskind, J.W., 1989. Expression of *Escherichia coli* *dnaA* and *mioC* genes as a function of growth rate. J. Bacteriol. 171, 4272-4280.
- Chiaramello, A.E., Zyskind, J.W., 1990. Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. J. Bacteriol. 172, 2013-2019.
- Choy, H.E., 2000. The study of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate-mediated transcription regulation in vitro using a coupled transcription-translation system. J. Biol. Chem. 275, 6783-6789.
- Cochran, J.W., Byrne, R.W., 1974. Isolation and properties of a ribosome-bound factor required for ppGpp and pppGpp synthesis in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 249, 353-360.
- Conter, A., Menchon, C., Gutierrez, C., 1997. Role of DNA supercoiling and RpoS sigma factor in the osmotic and growth phase-dependent induction of the gene *osmE* of *E. coli* K12. J. Mol. Biol. 273, 75-83.
- Cooper, S., Helmstetter, C.E., 1968. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. J. Mol. Biol. 31, 519-540.
- Cooper, T.F., Rozen, D.E., Lenski, R.E., 2003. Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 100, 1072-1077.
- Cooper, V.S., Lenski, R.E., 2000. The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. Nature 407, 736-739.
- Cooper, V.S., Schneider, D., Blot, M., Lenski, R.E., 2001. Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli* B. J. Bacteriol. 183, 2834-2841.
- Cosma, C.L., Danese, P.N., Carlson, J.H., Silhavy, T.J., Snyder, W.B., 1995. Mutational activation of the Cpx signal transduction pathway of *Escherichia coli* suppresses the toxicity conferred by certain envelope-associated stresses. Mol. Microbiol. 18, 491-505.
- Crozat, E., Philippe, N., Lenski, R.E., Geiselmann, J., Schneider, D., 2005. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. Genetics 169, 523-532.

- Csonka, L.N., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53, 121-147.
- Csonka, L.N., Hanson, A.D., 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 569-606.
- Cunningham, C.W., Jeng, K., Husti, J., Badgett, M., Molineux, I.J., Hillis, D.M., Bull, J.J., 1997. Parallel molecular evolution of deletions and nonsense mutations in bacteriophage T7. *Mol. Biol. Evol.* 14, 113-116.
- Czyz, A., Wegrzyn, G., 2005. The Obg subfamily of bacterial GTP-binding proteins: essential proteins of largely unknown functions that are evolutionarily conserved from bacteria to humans. *Acta Biochim. Pol.* 52, 35-43.
- Czyz, A., Zielke, R., Konopa, G., Wegrzyn, G., 2001. A *Vibrio harveyi* insertional mutant in the *cgtA* (*obg*, *yhbZ*) gene, whose homologues are present in diverse organisms ranging from bacteria to humans and are essential genes in many bacterial species. *Microbiology* 147, 183-191.
- D'Ari, R., Jaffe, A., Bouloc, P., Robin, A., 1988. Cyclic AMP and cell division in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 170, 65-70.
- Dame, R.T., 2005. The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin. *Mol. Microbiol.* 56, 858-870.
- Danese, P.N., Silhavy, T.J., 1998. CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J. Bacteriol.* 180, 831-839.
- Danese, P.N., Snyder, W.B., Cosma, C.L., Davis, L.J., Silhavy, T.J., 1995. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Genes Dev.* 9, 387-398.
- Daniel, R.A., Errington, J., 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* 113, 767-776.
- Datta, K., Skidmore, J.M., Pu, K., Maddock, J.R., 2004. The *Caulobacter crescentus* GTPase CgtAC is required for progression through the cell cycle and for maintaining 50S ribosomal subunit levels. *Mol. Microbiol.* 54, 1379-1392.
- De Pedro, M.A., Donachie, W.D., Holtje, J.V., Schwarz, H., 2001. Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein 2. *J. Bacteriol.* 183, 4115-4126.
- De Visser, J.A., Lenski, R.E., 2002. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XI. Rejection of non-transitive interactions as cause of declining rate of adaptation. *BMC. Evol. Biol.* 2, 19.
- Death, A., Ferenci, T., 1994. Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth with limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176, 5101-5107.
- Death, A., Notley, L., Ferenci, T., 1993. Derepression of LamB protein facilitates outer membrane permeation of carbohydrates into *Escherichia coli* under conditions of nutrient stress. *J. Bacteriol.* 175, 1475-1483.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E., Vischer, N.O., Nanninga, N., 2003. Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol. Microbiol.* 47, 539-547.
- Deng, S., Stein, R.A., Higgins, N.P., 2004. Transcription-induced barriers to supercoil diffusion in the *Salmonella typhimurium* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 3398-3403.
- Dennis, P.P., Ehrenberg, M., Bremer, H., 2004. Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 639-668.
- DiNardo, S., Voelkel, K.A., Sternglanz, R., Reynolds, A.E., Wright, A., 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell* 31, 43-51.
- DiRusso, C.C., Nyström, T., 1998. The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol. Microbiol.* 27, 1-8.
- Divakaruni, A.V., Loo, R.R., Xie, Y., Loo, J.A., Gober, J.W., 2005. The cell-shape protein MreC interacts with extracytoplasmic proteins including cell wall assembly complexes in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 18602-18607.
- Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59, 4310-4317.
- Dorman, C.J., Barr, G.C., Bhriain, N.N., Higgins, C.F., 1988. DNA supercoiling and the anaerobic and growth phase regulation of *tonB* gene expression. *J. Bacteriol.* 170, 2816-2826.
- Dorman, C.J., Deighan, P., 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 179-184.



- Dougherty, T.J., Pucci, M.J., 1994. Penicillin-binding proteins are regulated by RpoS during transitions in growth states of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 205-210.
- Drlica, K., 1992. Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 6, 425-433.
- Drolet, M., 2006. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology. *Mol. Microbiol.* 59, 723-730.
- Drolet, M., Broccoli, S., Rallu, F., Hraiky, C., Fortin, C., Masse, E., Baaklini, I., 2003. The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front Biosci.* 8, d210-d221.
- Durso, L.M., Smith, D., Hutkins, R.W., 2004. Measurements of fitness and competition in commensal *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6466-6472.
- Dutkiewicz, R., Slominska, M., Wegrzyn, G., Czyz, A., 2002. Overexpression of the *cgtA* (*yhbZ*, *obgE*) gene, coding for an essential GTP-binding protein, impairs the regulation of chromosomal functions in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 45, 440-445.
- Edwards, R.J., Sockett, R.E., Brookfield, J.F., 2002. A simple method for genome-wide screening for advantageous insertions of mobile DNAs in *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* 12, 863-867.
- El Khani, M.A., Stretton, R.J., 1981. Effect of growth medium on the lipid composition of log and stationary phase cultures of *Salmonella typhimurium*. *Microbios* 31, 161-169.
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 117-126.
- Farrell, M.J., Finkel, S.E., 2003. The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH and nutrient environment. *J. Bacteriol.* 185, 7044-7052.
- Fennell-Fezzie, R., Gradia, S.D., Akey, D., Berger, J.M., 2005. The MukF subunit of *Escherichia coli* condensin: architecture and functional relationship to kleisins. *EMBO J.* 24, 1921-1930.
- Ferenci, T., 2003. What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*? *Trends Microbiol.* 11, 457-461.
- Ferenci, T., 2005. Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. *Mol. Microbiol.* 57, 1-8.
- Ferrario, M., Ernsting, B.R., Borst, D.W., Wiese, D.E., Blumenthal, R.M., Matthews, R.G., 1995. The leucine-responsive regulatory protein of *Escherichia coli* negatively regulates transcription of *ompC* and *micF* and positively regulates translation of *ompF*. *J. Bacteriol.* 177, 103-113.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V., Gober, J.W., 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 51, 1321-1332.
- Figueroa-Bossi, N., Guerin, M., Rahmouni, R., Leng, M., Bossi, L., 1998. The supercoiling sensitivity of a bacterial tRNA promoter parallels its responsiveness to stringent control. *EMBO J.* 17, 2359-2367.
- Finkel, S.E., 2006. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 113-120.
- Finkel, S.E., Kolter, R., 1999. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 4023-4027.
- Finkel, S.E., Kolter, R., 2001. DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J. Bacteriol.* 183, 6288-6293.
- Fischer, R.A. 1930. The genetical theory of neutral selection. Oxford : Oxford University Press.
- Fishov, I., Zaritsky, A., Grover, N.B., 1995. On microbial states of growth. *Mol. Microbiol.* 15, 789-794.
- Fong, S.S., Joyce, A.R., Palsson, B.O., 2005. Parallel adaptive evolution cultures of *Escherichia coli* lead to convergent growth phenotypes with different gene expression states. *Genome Res.* 15, 1365-1372.
- Free, A., Dorman, C.J., 1994. *Escherichia coli tyrT* gene transcription is sensitive to DNA supercoiling in its native chromosomal context: effect of DNA topoisomerase IV overexpression on *tyrT* promoter function. *Mol. Microbiol.* 14, 151-161.
- Frenkiel-Krispin, D., Ben Avraham, I., Englander, J., Shimoni, E., Wolf, S.G., Minsky, A., 2004. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria. *Mol. Microbiol.* 51, 395-405.
- Friesen, J.D., An, G., Fii, N.P., 1978. Nonsense and insertion mutants in the *relA* gene of *E. coli*: cloning *relA*. *Cell* 15, 1187-1197.
- Fujisaki, S., Nishino, T., Katsuki, H., 1986. Biosynthesis of isoprenoids in intact cells of *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)* 99, 1137-1146.
- Funnell, B.E., Baker, T.A., Kornberg, A., 1987. *In vitro* assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Biol. Chem.* 262, 10327-10334.

- Furano, A.V., Wittel, F.P., 1977. Effect of the *relA* gene on derepression of amino acid biosynthetic enzymes in growing *Escherichia coli* depends on the pathway being derepressed. *J. Bacteriol.* 132, 352-355.
- Gaal, T., Bartlett, M.S., Ross, W., Turnbough, C.L., Jr., Gourse, R.L., 1997. Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science* 278, 2092-2097.
- Gallant, J., Cashel, M., 1967. On the mechanism of amino acid control of ribonucleic acid biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 25, 545-553.
- Gallant, J., Palmer, L., Pao, C.C., 1977. Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell* 11, 181-185.
- Gellert, M., 1981. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 879-910.
- Gentry, D.R., Cashel, M., 1995. Cellular localization of the *Escherichia coli* SpoT protein. *J. Bacteriol.* 177, 3890-3893.
- Gentry, D.R., Cashel, M., 1996. Mutational analysis of the *Escherichia coli* *spoT* gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation. *Mol. Microbiol.* 19, 1373-1384.
- Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Nguyen, L.H., Jensen, D.B., Cashel, M., 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175, 7982-7989.
- Gerrish, P.J., Lenski, R.E., 1998. The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 102-103, 127-144.
- Ghigo, J.M., Weiss, D.S., Chen, J.C., Yarrow, J.C., Beckwith, J., 1999. Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. *Mol. Microbiol.* 31, 725-737.
- Ghuysen, J.M., 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 37-67.
- Givens, R.M., Lin, M.H., Taylor, D.J., Mechold, U., Berry, J.O., Hernandez, V.J., 2004. Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J. Biol. Chem.* 279, 7495-7504.
- Gmuender, H., Kuratli, K., Di Padova, K., Gray, C.P., Keck, W., Evers, S., 2001. Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res.* 11, 28-42.
- Godfrey, H.P., Bugrysheva, J.V., Cabello, F.C., 2002. The role of the stringent response in the pathogenesis of bacterial infections. *Trends Microbiol.* 10, 349-351.
- Goffin, C., Ghuysen, J.M., 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1079-1093.
- Goodell, W., Tomasz, A., 1980. Alteration of *Escherichia coli* murein during amino acid starvation. *J. Bacteriol.* 144, 1009-1016.
- Gordia, S., Gutierrez, C., 1996. Growth-phase-dependent expression of the osmotically inducible gene *osmC* of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 19, 729-736.
- Gordon, G.S., Sitnikov, D., Webb, C.D., Teleman, A., Straight, A., Losick, R., Murray, A.W., Wright, A., 1997. Chromosome and low copy plasmid segregation in *E. coli*: visual evidence for distinct mechanisms. *Cell* 90, 1113-1121.
- Gourse, R.L., 1988. Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 16, 9789-9809.
- Gourse, R.L., Gaal, T., Aiyar, S.E., Barker, M.M., Estrem, S.T., Hirvonen, C.A., Ross, W., 1998. Strength and regulation without transcription factors: lessons from bacterial rRNA promoters. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63, 131-139.
- Graeme-Cook, K.A., May, G., Bremer, E., Higgins, C.F., 1989. Osmotic regulation of porin expression: a role for DNA supercoiling. *Mol. Microbiol.* 3, 1287-1294.
- Granier, B., Jamin, M., Adam, M., Galleni, M., Lakaye, B., Zorzi, W., Grandchamps, J., Wilkin, J.M., Fraipont, C., Joris, B., 1994. Serine-type D-Ala-D-Ala peptidases and penicillin-binding proteins. *Methods Enzymol.* 244, 249-266.
- Grant, R.A., Filman, D.J., Finkel, S.E., Kolter, R., Hogle, J.M., 1998. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Biol.* 5, 294-303.
- Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M., Glaser, G., 2001. Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J. Bacteriol.* 183, 570-579.
- Gross, C.A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., Young, B., 1998. The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63, 141-155.
- Gully, D., Moinier, D., Loiseau, L., Bouveret, E., 2003. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett.* 548, 90-96.

- Gyaneshwar,P., Paliy,O., McAuliffe,J., Jones,A., Jordan,M.I., Kustu,S., 2005. Lessons from *Escherichia coli* genes similarly regulated in response to nitrogen and sulfur limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 3453-3458.
- Hacker,J., Blum-Oehler,G., Hochhut,B., Dobrindt,U., 2003. The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 50, 321-330.
- Hammer,B.K., Swanson,M.S., 1999. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* 33, 721-731.
- Harris,B.Z., Kaiser,D., Singer,M., 1998. The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* 12, 1022-1035.
- Harshman,R.B., Yamazaki,H., 1972. MSI accumulation induced by sodium chloride. *Biochemistry* 11, 615-618.
- Harz,H., Burgdorf,K., Holtje,J.V., 1990. Isolation and separation of the glycan strands from murein of *E. coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 190, 120-128.
- Haseltine,W.A., Block,R., 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, 1564-1568.
- Haseltine,W.A., Block,R., Gilbert,W., Weber,K., 1972. MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature* 238, 381-384.
- Hatfield,G.W., Benham,C.J., 2002. DNA topology-mediated control of global gene expression in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 36, 175-203.
- Heath,R.J., Jackowski,S., Rock,C.O., 1994. Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in *Escherichia coli* is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (*plsB*). *J. Biol. Chem.* 269, 26584-26590.
- Heidrich,C., Ursinus,A., Berger,J., Schwarz,H., Holtje,J.V., 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 6093-6099.
- Heinemeyer,E.A., Geis,M., Richter,D., 1978. Degradation of guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate in vitro by the *spoT* gene product of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 89, 125-131.
- Heinemeyer,E.A., Richter,D., 1977. In vitro degradation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) by an enzyme associated with the ribosomal fraction from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 84, 357-361.
- Helmann,J.D., Chamberlin,M.J., 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 839-872.
- Hengge-Aronis,R., 2002a. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 341-346.
- Hengge-Aronis,R., 2002b. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 373-95, table.
- Hernandez,V.J., Cashel,M., 1995. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 252, 536-549.
- Herring,C.D., Glasner,J.D., Blattner,F.R., 2003. Gene replacement without selection: regulated suppression of amber mutations in *Escherichia coli*. *Gene* 311, 153-163.
- Hesketh,A., Sun,J., Bibb,M., 2001. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 39, 136-144.
- Higgins,C.F., Dorman,C.J., Stirling,D.A., Waddell,L., Booth,I.R., May,G., Bremer,E., 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* 52, 569-584.
- Higgins,N.P., Yang,X., Fu,Q., Roth,J.R., 1996. Surveying a supercoil domain by using the gamma delta resolution system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 178, 2825-2835.
- Hirano,T., 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 311-322.
- Hirsch,M., Elliott,T., 2002. Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 5077-5087.
- Hogg,T., Mechold,U., Malke,H., Cashel,M., Hilgenfeld,R., 2004. Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell* 117, 57-68.

- Holt, R.D., 1996. Demographic constraints in evolution: towards unifying the evolutionary theories of senescence and niche conservatism. *Evol. Ecol.* 10, 1-11.
- Holtje, J.V., 1995. From growth to autolysis: the murein hydrolases in *E. coli*. *Arch. Microbiol.* 164, 243-254.
- Holtje, J.V., 1996. Molecular interplay of murein synthases and murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 2, 99-103.
- Holtje, J.V., 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 181-203.
- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A., Bertin, P., 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol. Microbiol.* 40, 20-36.
- Hraiky, C., Raymond, M.A., Drolet, M., 2000. RNase H overproduction corrects a defect at the level of transcription elongation during rRNA synthesis in the absence of DNA topoisomerase I in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 11257-11263.
- Hsieh, L.S., Rouviere-Yaniv, J., Drlica, K., 1991. Bacterial DNA supercoiling and [ATP]/[ADP] ratio: changes associated with salt shock. *J. Bacteriol.* 173, 3914-3917.
- Hsu, L.M., Vo, N.V., Chamberlin, M.J., 1995. *E. coli* transcript cleavage factors GreA and GreB stimulate promoter escape and gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11588-11592.
- Huisman, G.W., Siegel, D.A., Zambrano M.M., Kolter R., 1996. Morphological and physiological changes during stationary phase. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. 1672-1682. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Ikemura, T., Dahlberg, J.E., 1973. Small ribonucleic acids of *Escherichia coli*. II. Noncoordinate accumulation during stringent control. *J. Biol. Chem.* 248, 5033-5041.
- Inglede, W.J., Poole, R.K., 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48, 222-271.
- Irr, J.D., 1972. Control of nucleotide metabolism and ribosomal ribonucleic acid synthesis during nitrogen starvation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 110, 554-561.
- Ishiguro, E.E., Ramey, W.D., 1976. Stringent control of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 127, 1119-1126.
- Ishiguro, E.E., Ramey, W.D., 1978. Involvement of the *relA* gene product and feedback inhibition in the regulation of DUP-N-acetylmuramyl-peptide synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 135, 766-774.
- Ishiguro, E.E., Ramey, W.D., 1980. Inhibition of *in vitro* peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli* by guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate. *Can. J. Microbiol.* 26, 1514-1518.
- Ishihama, A., 2000. Functional modulation of *E. coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 499-518.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., Spratt, B.G., 1986. Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *J. Biol. Chem.* 261, 7024-7031.
- Iuchi, S., Kuritzkes, D.R., Lin, E.C., 1986. Three classes of *Escherichia coli* mutants selected for aerobic expression of fumarate reductase. *J. Bacteriol.* 168, 1415-1421.
- Iwaya, M., Jones, C.W., Khorana, J., Strominger, J.L., 1978. Mapping of the mecillinam-resistant, round morphological mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133, 196-202.
- Izutsu, K., Wada, A., Wada, C., 2001. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells* 6, 665-676.
- James, R., Haga, J.Y., Pardee, A.B., 1975. Inhibition of an early event in the cell division cycle of *Escherichia coli* by FL1060, an amidinopenicillanic acid. *J. Bacteriol.* 122, 1283-1292.
- Jishage, M., Ishihama, A., 1995. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J. Bacteriol.* 177, 6832-6835.
- Jishage, M., Ishihama, A., 1998. A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4953-4958.
- Jishage, M., Ishihama, A., 1999. Transcriptional organization and *in vivo* role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase sigma D. *J. Bacteriol.* 181, 3768-3776.
- Jishage, M., Iwata, A., Ueda, S., Ishihama, A., 1996. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.* 178, 5447-5451.
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., Nyström, T., 2002. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* 16, 1260-1270.

- Johansson,J., Balsalobre,C., Wang,S.Y., Urbonaviciene,J., Jin,D.J., Sonden,B., Uhlin,B.E., 2000. Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: a link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in *Escherichia coli*. *Cell* 102, 475-485.
- Jones,L.J., Carballido-Lopez,R., Errington,J., 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104, 913-922.
- Jones,P.G., Cashel,M., Glaser,G., Neidhardt,F.C., 1992. Function of a relaxed-like state following temperature downshifts in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 3903-3914.
- Joseleau-Petit,D., Thevenet,D., D'Ari,R., 1994. ppGpp concentration, growth without PBP2 activity, and growth-rate control in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 13, 911-917.
- Jovanovich,S.B., Lebowitz,J., 1987. Estimation of the effect of coumermycin A1 on *Salmonella typhimurium* promoters by using random operon fusions. *J. Bacteriol.* 169, 4431-4435.
- Kadner,R.J. 1996. Cytoplasmic membrane. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. I, 58-87. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Kang,P.J., Craig,E.A., 1990. Identification and characterization of a new *Escherichia coli* gene that is a dosage-dependent suppressor of a *dnaK* deletion mutation. *J. Bacteriol.* 172, 2055-2064.
- Kano,Y., Wada,M., Imamoto,F., 1988. Genetic characterization of the gene *hupA* encoding the HU-2 protein of *Escherichia coli*. *Gene* 69, 331-335.
- Kar,S., Edgar,R., Adhya,S., 2005. Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 16397-16402.
- Karamanos,Y., 1997. Endo-N-acetyl-beta-D-glucosaminidases and their potential substrates: structure/function relationships. *Res. Microbiol.* 148, 661-671.
- Karimova,G., Dautin,N., Ladant,D., 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* 187, 2233-2243.
- Karimova,G., Pidoux,J., Ullmann,A., Ladant,D., 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5752-5756.
- Kasai,K., Kanno,T., Endo,Y., Wakasa,K., Tozawa,Y., 2004. Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of a higher plant: association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline. *Nucleic Acids Res.* 32, 5732-5741.
- Kim,S., Watanabe,K., Suzuki,H., Watarai,M., 2005. Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication. *Microbiology* 151, 1607-1617.
- Kimura,M., 1983. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. *Mol. Biol. Evol.* 1, 84-93.
- King,T., Ishihama,A., Kori,A., Ferenci,T., 2004. A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 5614-5620.
- Kingston,R.E., Nierman,W.C., Chamberlin,M.J., 1981. A direct effect of guanosine tetraphosphate on pausing of *Escherichia coli* RNA polymerase during RNA chain elongation. *J. Biol. Chem.* 256, 2787-2797.
- Klebba,P.E., McIntosh,M.A., Neilands,J.B., 1982. Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 149, 880-888.
- Kobayashi,G., Moriya,S., Wada,C., 2001. Deficiency of essential GTP-binding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol. Microbiol.* 41, 1037-1051.
- Kok,J., Trach,K.A., Hoch,J.A., 1994. Effects on *Bacillus subtilis* of a conditional lethal mutation in the essential GTP-binding protein Obg. *J. Bacteriol.* 176, 7155-7160.
- Kolonin,M.G., Zhong,J., Finley,R.L., 2000. Interaction mating methods in two-hybrid systems. *Methods Enzymol.* 328, 26-46.
- Koonin,E.V., Rudd,K.E., 1993. SpoU protein of *Escherichia coli* belongs to a new family of putative rRNA methylases. *Nucleic Acids Res.* 21, 5519.
- Kornberg,A., Rao,N.N., Ault-Riche,D., Loewen,P.C., von,O., I, Switala,J., Mulvey,M.R., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 89-125.
- Kruse,T., Bork-Jensen,J., Gerdes,K., 2005. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol. Microbiol.* 55, 78-89.
- Kumari,S., Beatty,C.M., Browning,D.F., Busby,S.J., Simel,E.J., Hovel-Miner,G., Wolfe,A.J., 2000. Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182, 4173-4179.
- Kuroda,A., Murphy,H., Cashel,M., Kornberg,A., 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21240-21243.

- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N., Ishihama, A., 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J. Biol. Chem.* 271, 1998-2004.
- Kvint, K., Farewell, A., Nyström, T., 2000. RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J. Biol. Chem.* 275, 14795-14798.
- Laffler, T., Gallant, J.A., 1974. Stringent control of protein synthesis in *E. coli*. *Cell* 3, 47-49.
- Lamond, A.I., 1985. Supercoiling response of a bacterial tRNA gene. *EMBO J.* 4, 501-507.
- Landgraf, J.R., Wu, J., Calvo, J.M., 1996. Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 6930-6936.
- Lange, R., Fischer, D., Hengge-Aronis, R., 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 4676-4680.
- Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1991a. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *E. coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J. Bacteriol.* 173, 4474-4481.
- Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1991b. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 49-59.
- Lange, R., Hengge-Aronis, R., 1994. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 8, 1600-1612.
- Lau, I.F., Filipe, S.R., Soballe, B., Okstad, O.A., Barre, F.X., Sherratt, D.J., 2003. Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol. Microbiol.* 49, 731-743.
- Laurie, A.D., Bernardo, L.M., Sze, C.C., Skarfstad, E., Szalewska-Palasz, A., Nyström, T., Shingler, V., 2003. The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 278, 1494-1503.
- Lazzarini, R.A., Cashel, M., Gallant, J., 1971. On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246, 4381-4385.
- Leaver, M., Errington, J., 2005. Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 57, 1196-1209.
- Lederberg, S., 1966. Genetics of host-controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 91, 1029-1036.
- Leduc, M., Joseleau-Petit, D., Rothfield, L.I., 1989. Interactions of membrane lipoproteins with the murein sacculus of *Escherichia coli* as shown by chemical crosslinking studies of intact cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 51, 11-14.
- Lemos, J.A., Brown, T.A., Jr., Burne, R.A., 2004. Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 72, 1431-1440.
- Lenski, R.E., Rose, M.R., Simpsn, S.C., Tadler, S.C., 1991. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2000 generations. *Am. Nat.* 138, 1315-1341.
- Lenski, R.E., 1991. Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology* 15, 173-192.
- Lenski, R.E., Mongold, J.A., Sniegowski, P.D., Travisano, M., Vasi, F., Gerrish, P.J., Schmidt, T.M., 1998. Evolution of competitive fitness in experimental populations of *E. coli*: what makes one genotype a better competitor than another? *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 35-47.
- Lenski, R.E., Travisano, M., 1994. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 6808-6814.
- Lenski, R.E., Winkworth, C.L., Riley, M.A., 2003. Rates of DNA sequence evolution in experimental populations of *Escherichia coli* during 20,000 generations. *J. Mol. Evol.* 56, 498-508.
- Lenski, R.E., Mongold, J.A., 2000. Cell size, shape, and fitness in evolving populations of bacteria. 221-235. J. H. Brown and G. B. West, eds. *Scaling in Biology*. Oxford University Press.
- Lesley, S.A., Burgess, R.R., 1989. Characterization of the *E. coli* transcription factor sigma 70: localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry* 28, 7728-7734.
- Lesley, S.A., Jovanovich, S.B., Tse-Dinh, Y.C., Burgess, R.R., 1990. Identification of a heat shock promoter in the *topA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 6871-6874.
- Li, S.J., Cronan, J.E., Jr., 1992. The genes encoding the two carboxyltransferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* 267, 16841-16847.
- Li, Y., Sergueev, K., Austin, S., 2002. The segregation of the *Escherichia coli* origin and terminus of replication. *Mol. Microbiol.* 46, 985-996.

- Li, Y., Youngren, B., Sergueev, K., Austin, S., 2003. Segregation of the *Escherichia coli* chromosome terminus. *Mol. Microbiol.* 50, 825-834.
- Liao, X., Hancock, R.E., 1997. Identification of a penicillin-binding protein 3 homolog, PBP3x, in *Pseudomonas aeruginosa*: gene cloning and growth phase-dependent expression. *J. Bacteriol.* 179, 1490-1496.
- Lima, C.D., Wang, J.C., Mondragon, A., 1994. Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I. *Nature* 367, 138-146.
- Lin, E.C.C. 1996. Dissimilatory pathways for sugars, polyols and carboxylates. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. 307-341. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Lin, B., Covalle, K.L., Maddock, J.R., 1999. The *Caulobacter crescentus* CgtA protein displays unusual guanine nucleotide binding and exchange properties. *J. Bacteriol.* 181, 5825-5832.
- Lin, B., Maddock, J.R., 2001. The N-terminal domain of the *Caulobacter crescentus* CgtA protein does not function as a guanine nucleotide exchange factor. *FEBS Lett.* 489, 108-111.
- Lin, B., Thayer, D.A., Maddock, J.R., 2004. The *Caulobacter crescentus* CgtAC protein cosediments with the free 50S ribosomal subunit. *J. Bacteriol.* 186, 481-489.
- Lin, D.C., Levin, P.A., Grossman, A.D., 1997. Bipolar localization of a chromosome partition protein in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4721-4726.
- Link, A.J., Phillips, D., Church, G.M., 1997. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179, 6228-6237.
- Lipmann, F., Sy, J., 1976. The enzymic mechanism of guanosine 5',3'-polyphosphate synthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 17, 1-14.
- Little, R., Ryals, J., Bremer, H., 1983. *rpoB* mutation in *Escherichia coli* alters control of ribosome synthesis by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* 154, 787-792.
- Liu, X., Ferenci, T., 1998. Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 3917-3922.
- Liu, X., Ferenci, T., 2001. An analysis of multifactorial influences on the transcriptional control of *ompF* and *ompC* porin expression under nutrient limitation. *Microbiology* 147, 2981-2989.
- Liu, X., Ng, C., Ferenci, T., 2000. Global adaptations resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J. Bacteriol.* 182, 4158-4164.
- Lobner-Olesen, A., Skarstad, K., Hansen, F.G., von Meyenburg, K., Boye, E., 1989. The DnaA protein determines the initiation mass of *Escherichia coli* K-12. *Cell* 57, 881-889.
- Loewen, P.C., von, O., I, Switala, J., Mulvey, M.R., 1993. KatF (sigma S) synthesis in *Escherichia coli* is subject to posttranscriptional regulation. *J. Bacteriol.* 175, 2150-2153.
- Lund, F., Tybring, L., 1972. 6-amidinopenicillanic acids--a new group of antibiotics. *Nat. New Biol.* 236, 135-137.
- Lutkenhaus, J., Addinall, S.G., 1997. Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 93-116.
- Ma, X., Ehrhardt, D.W., Margolin, W., 1996. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 12998-13003.
- Ma, H.W., Kumar, B., Ditges, U., Gunzer, F., Buer, J., Zeng, A.P., 2004. An extended transcriptional regulatory network of *Escherichia coli* and analysis of its hierarchical structure and network motifs. *Nucleic Acids Res.* 32, 6643-6649.
- Madan, B.M., Teichmann, S.A., Aravind, L., 2006. Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks. *J. Mol. Biol.* 358, 614-633.
- Maddock, J., Bhatt, A., Koch, M., Skidmore, J., 1997. Identification of an essential *Caulobacter crescentus* gene encoding a member of the Obg family of GTP-binding proteins. *J. Bacteriol.* 179, 6426-6431.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C.O., Cronan, J.E., Jr., 1993. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 57, 522-542.
- Magnusson, L.U., Nyström, T., Farewell, A., 2003. Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *J. Biol. Chem.* 278, 968-973.
- Maharjan, R., Seeto, S., Notley-McRobb, L., Ferenci, T., 2006. Clonal Adaptive Radiation in a Constant Environment. *Science*.
- Majerus, P.W., Alberts, A.W., Vagelos, P.R., 1964. The acyl carrier protein of fatty acid synthesis: purification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 51, 1231-1238.

- Makinoshima,H., Aizawa,S., Hayashi,H., Miki,T., Nishimura,A., Ishihama,A., 2003. Growth phase-coupled alterations in cell structure and function of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185, 1338-1345.
- Makinoshima,H., Nishimura,A., Ishihama,A., 2002. Fractionation of *Escherichia coli* cell populations at different stages during growth transition to stationary phase. Mol. Microbiol. 43, 269-279.
- Manche,K., Notley-McRobb,L., Ferenci,T., 1999. Mutational adaptation of *E. coli* to glucose limitation involves distinct evolutionary pathways in aerobic and oxygen-limited environments. Genetics 153, 5-12.
- Margot,P., Wahlen,M., Gholamhoseinian,A., Piggot,P., Karamata,D., 1998. The *lytE* gene of *Bacillus subtilis* 168 encodes a cell wall hydrolase. J. Bacteriol. 180, 749-752.
- Marschall,C., Labrousse,V., Kreimer,M., Weichart,D., Kolb,A., Hengge-Aronis,R., 1998. Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on sigma S and requires activation by cAMP-CRP. J. Mol. Biol. 276, 339-353.
- Martinez-Antonio,A., Collado-Vides,J., 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 6, 482-489.
- Martinez-Costa,O.H., Arias,P., Romero,N.M., Parro,V., Mellado,R.P., Malpartida,F., 1996. A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthetic genes. J. Biol. Chem. 271, 10627-10634.
- Martinez-Morales,F., Borges,A.C., Martinez,A., Shanmugam,K.T., Ingram,L.O., 1999. Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. J. Bacteriol. 181, 7143-7148.
- Matsushashi,S., Kamiryo,T., Blumberg,P.M., Linnett,P., Willoughby,E., Strominger,J.L., 1974. Mechanism of action and development of resistance to a new amidino penicillin. J. Bacteriol. 117, 578-587.
- Matsuzawa,H., Hayakawa,K., Sato,T., Imahori,K., 1973. Characterization and genetic analysis of a mutant of *Escherichia coli* K-12 with rounded morphology. J. Bacteriol. 115, 436-442.
- McAdams,H.H., Srinivasan,B., Arkin,A.P., 2004. The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. Nat. Rev. Genet. 5, 169-178.
- McGarrrity,J.T., Armstrong,J.B., 1975. The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. Biochim. Biophys. Acta 398, 258-264.
- McIntosh,M.A., Earhart,C.F., 1976. Effect of iron of the relative abundance of two large polypeptides of the *Escherichia coli* outer membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 315-322.
- McIntosh,M.A., Earhart,C.F., 1977. Coordinate regulation by iron of the synthesis of phenolate compounds and three outer membrane proteins in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 131, 331-339.
- McLeod,S.M., Johnson,R.C., 2001. Control of transcription by nucleoid proteins. Curr. Opin. Microbiol. 4, 152-159.
- McNab R.M. 1987. Flagella. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. 70-83. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Mechold,U., Cashel,M., Steiner,K., Gentry,D., Malke,H., 1996. Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. J. Bacteriol. 178, 1401-1411.
- Mechold,U., Murphy,H., Brown,L., Cashel,M., 2002. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from *S. equisimilis*. J. Bacteriol. 184, 2878-2888.
- Mengin-Lecreulx,D., van Heijenoort,J., 1985. Effect of growth conditions on peptidoglycan content and cytoplasmic steps of its biosynthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 163, 208-212.
- Meselson,M., Stahl,F.W., 1958. The replication of DNA in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 44, 671-682.
- Metzger,S., Schreiber,G., Aizenman,E., Cashel,M., Glaser,G., 1989. Characterization of the *relA1* mutation and a comparison of *relA1* with new *relA* null alleles in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264, 21146-21152.
- Millers J.H. Experiments in molecular genetics. 1972. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mittenhuber,G., 2001. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3, 585-600.
- Mizuno,T., 1984. Regulation of gene expression by a small RNA transcript (*micRNA*): osmoregulation in *E. coli*. Seikagaku 56, 113-119.
- Mizuno,T., Mizushima,S., 1990. Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. Mol. Microbiol. 4, 1077-1082.
- Mizushima,T., Ohtsuka,Y., Miki,T., Sekimizu,K., 1994. Temperature shift-up leads to simultaneous and continuous plasmid DNA relaxation and induction of DnaK and GroEL proteins in anaerobically growing *Escherichia coli* cells. FEMS Microbiol. Lett. 121, 333-336.



- Moche,M., Schneider,G., Edwards,P., Dehesh,K., Lindqvist,Y., 1999. Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 6031-6034.
- Moore,B.A., Jevons,S., Brammer,K.W., 1979. Peptidoglycan transpeptidase inhibition in *P. aeruginosa* and *E. coli* by Penicillins and Cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 513-517.
- Moris,M., Braeken,K., Schoeters,E., Verreth,C., Beullens,S., Vanderleyden,J., Michiels,J., 2005. Effective symbiosis between *Rhizobium etli* and *Phaseolus vulgaris* requires the alarmone ppGpp. *J. Bacteriol.* 187, 5460-5469.
- Moriya,H., Kasai,H., Isono,K., 1995. Cloning and characterization of the *hrpA* gene in the *terC* region of *Escherichia coli* that is highly similar to the DEAH family RNA helicase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23, 595-598.
- Morona,R., Klose,M., Henning,U., 1984. *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *J. Bacteriol.* 159, 570-578.
- Moulder,J.W., 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.* 49, 298-337.
- Murakami,K.S., Masuda,S., Darst,S.A., 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296, 1280-1284.
- Murphy,K.C., Campellone,K.G., Poteete,A.R., 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* 246, 321-330.
- Murphy,L.D., Zimmerman,S.B., 1997. Stabilization of compact spermidine nucleoids from *Escherichia coli* under crowded conditions: implications for *in vivo* nucleoid structure. *J. Struct. Biol.* 119, 336-346.
- Murray,K.D., Bremer,H., 1996. Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 259, 41-57.
- Muskhelishvili,G., Buckle,M., Heumann,H., Kahmann,R., Travers,A.A., 1997. FIS activates sequential steps during transcription initiation at a stable RNA promoter. *EMBO J.* 16, 3655-3665.
- Muskhelishvili,G., Travers,A., 2003. Transcription factor as a topological homeostat. *Front Biosci.* 8, d279-d285.
- Muskhelishvili,G., Travers,A.A., Heumann,H., Kahmann,R., 1995. FIS and RNA polymerase holoenzyme form a specific nucleoprotein complex at a stable RNA promoter. *EMBO J.* 14, 1446-1452.
- Na,H.S., Kim,H.J., Lee,H.C., Hong,Y., Rhee,J.H., Choy,H.E., 2005. Immune response induced by *Salmonella typhimurium* defective in ppGpp synthesis. *Vaccine*.
- Nair,S., Finkel,S.E., 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J. Bacteriol.* 186, 4192-4198.
- Nakatsu,C.H., Korona,R., Lenski,R.E., de Bruijn,F.J., Marsh,T.L., Forney,L.J., 1998. Parallel and divergent genotypic evolution in experimental populations of *Ralstonia sp.* *J. Bacteriol.* 180, 4325-4331.
- Neidhardt,F.C., 1963. Properties of a bacterial mutant lacking amino acid control of RNA synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 365-379.
- Newman,C.N., Kubitschek,H.E., 1978. Variation in periodic replication of the chromosome in *Escherichia coli* B/rTT. *J. Mol. Biol.* 121, 461-471.
- Nikaido,H. 1996. Outer Membrane. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. I, 29-47. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Nikaido,H., Rosenberg,E.Y., 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bacteriol.* 153, 241-252.
- Nikaido,H., Vaara,M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49, 1-32.
- Niki,H., Jaffe,A., Imamura,R., Ogura,T., Hiraga,S., 1991. The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. *EMBO J.* 10, 183-193.
- Niki,H., Yamaichi,Y., Hiraga,S., 2000. Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 14, 212-223.
- Nilsson,L., Vanet,A., Vijgenboom,E., Bosch,L., 1990. The role of FIS in trans activation of stable RNA operons of *E. coli*. *EMBO J.* 9, 727-734.
- Nilsson,L., Verbeek,H., Vijgenboom,E., van Drunen,C., Vanet,A., Bosch,L., 1992. FIS-dependent trans activation of stable RNA operons of *E. coli* under various growth conditions. *J. Bacteriol.* 174, 921-929.
- Ninnemann,O., Koch,C., Kahmann,R., 1992. The *E.coli* *fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J.* 11, 1075-1083.

- Nishi,K., Morel-Deville,F., Hershey,J.W., Leighton,T., Schnier,J., 1988. An eIF-4A-like protein is a suppressor of an *Escherichia coli* mutant defective in 50S ribosomal subunit assembly. *Nature* 336, 496-498.
- Nosil,P., Crespi,B.J., Sandoval,C.P., 2002. Host-plant adaptation drives the parallel evolution of reproductive isolation. *Nature* 417, 440-443.
- Notley-McRobb,L., King,T., Ferenci,T., 2002. *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J. Bacteriol.* 184, 806-811.
- Notley-McRobb,L., Seeto,S., Ferenci,T., 2003. The influence of cellular physiology on the initiation of mutational pathways in *Escherichia coli* populations. *Proc. Biol. Sci.* 270, 843-848.
- Novick,A., Szilard,L., 1950. Description of the chemostat. *Science* 112, 715-716.
- Nyström,T., 2004. Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 161-181.
- Ogata,Y., Inoue,R., Mizushima,T., Kano,Y., Miki,T., Sekimizu,K., 1997. Heat shock-induced excessive relaxation of DNA in *Escherichia coli* mutants lacking the histone-like protein HU. *Biochim. Biophys. Acta* 1353, 298-306.
- Ogura,T., Boulloc,P., Niki,H., D'Ari,R., Hiraga,S., Jaffe,A., 1989. Penicillin-binding protein 2 is essential in wild-type *Escherichia coli* but not in *lov* or *cya* mutants. *J. Bacteriol.* 171, 3025-3030.
- Ohlsen,K.L., Gralla,J.D., 1992. Melting during steady-state transcription of the *rrnB* P1 promoter *in vivo* and *in vitro*. *J. Bacteriol.* 174, 6071-6075.
- Okamoto,S., Ochi,K., 1998. An essential GTP-binding protein functions as a regulator for differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 30, 107-119.
- Olsen,A., Jonsson,A., Normark,S., 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652-655.
- Omura,S., 1981. Cerulenin. *Methods Enzymol.* 72, 520-532.
- Ostrovsky,d.S., O'Brien,K., Maloy,S., 1991. Regulation of proline utilization in *Salmonella typhimurium*: a membrane-associated dehydrogenase binds DNA in vitro. *J. Bacteriol.* 173, 211-219.
- Papadopoulos,D., Schneider,D., Meier-Eiss,J., Arber,W., Lenski,R.E., Blot,M., 1999. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3807-3812.
- Paredes,C.J., Alsaker,K.V., Papoutsakis,E.T., 2005. A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 969-978.
- Patten,C.L., Kirchhof,M.G., Schertzberg,M.R., Morton,R.A., Schellhorn,H.E., 2004. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Genet. Genomics* 272, 580-591.
- Paul,B.J., Barker,M.M., Ross,W., Schneider,D.A., Webb,C., Foster,J.W., Gourse,R.L., 2004. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118, 311-322.
- Paul,B.J., Berkmen,M.B., Gourse,R.L., 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 7823-7828.
- Pedersen,F.S., Kjeldgaard,N.O., 1977. Analysis of the *relA* gene product of *E. coli*. *Eur. J. Biochem.* 76, 91-97.
- Pelosi,L., Kuhn,L., Guetta,D., Garin,J., Geiselmann,J., Lenski,R.E., Schneider,D., 2006. Parallel changes in global protein profiles during long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. *Genetics*. May 15.
- Pemberton,I.K., Muskhelishvili,G., Travers,A.A., Buckle,M., 2000. The G+C-rich discriminator region of the *tyrT* promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *J. Mol. Biol.* 299, 859-864.
- Perederina,A., Svetlov,V., Vassilyeva,M.N., Tahirov,T.H., Yokoyama,S., Artsimovitch,I., Vassilyev,D.G., 2004. Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* 118, 297-309.
- Peter,B.J., Arsuaga,J., Breier,A.M., Khodursky,A.B., Brown,P.O., Cozzarelli,N.R., 2004. Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol.* 5, R87.
- Philippe,N., Alcaraz,J.P., Coursange,E., Geiselmann,J., Schneider,D., 2004. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid* 51, 246-255.
- Pisabarro,A.G., de Pedro,M.A., Vazquez,D., 1985. Structural modifications in the peptidoglycan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. *J. Bacteriol.* 161, 238-242.
- Pizarro-Cerda,J., Tedin,K., 2004. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* 52, 1827-1844.

- Pogliano, J., Pogliano, K., Weiss, D.S., Losick, R., Beckwith, J., 1997. Inactivation of FtsI inhibits constriction of the FtsZ cytokinetic ring and delays the assembly of FtsZ rings at potential division sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 559-564.
- Postle, K., 1993. TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 591-601.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W.J.G.R. 1996. Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate Phosphotransferase Systems. *E. coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. I, 1149-1174. Neidhardt, F.C. (Ed), ASM Press, Washington.
- Postow, L., Hardy, C.D., Arsuaga, J., Cozzarelli, N.R., 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* 18, 1766-1779.
- Potrykus, K., Vinella, D., Murphy, H., Szalewska-Palasz, A., D'Ari, R., Cashel, M., 2006. Antagonistic regulation of *Escherichia coli* ribosomal RNA *rrnB* P1 promoter activity by GreA and DksA. *J. Biol. Chem.*
- Potrykus, K., Wegrzyn, G., Hernandez, V.J., 2004. Direct stimulation of the *lambda*p<sub>Q</sub> promoter by the transcription effector guanosine-3',5'-(bis)pyrophosphate in a defined *in vitro* system. *J. Biol. Chem.* 279, 19860-19866.
- Powell, B.S., Court DL, 1998. Control of *ftsZ* expression, cell division, and glutamine metabolism in Luria-Bertani medium by the alarmone ppGpp in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 1053-1062.
- Powell, B.S., Rivas, M.P., Court DL, Nakamura, Y., Turnbough, C.L., Jr., 1994. Rapid confirmation of single copy *lambda* prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res.* 22, 5765-5766.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., Dorel, C., 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J. Bacteriol.* 183, 7213-7223.
- Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., Barry, C.E., III, 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* 182, 4889-4898.
- Pruss, G.J., Drlica, K., 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* 56, 521-523.
- Pruss, G.J., Manes, S.H., Drlica, K., 1982. *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell* 31, 35-42.
- Rafaëli-Eshkol, D., Hershko, A., 1974. Regulation of intracellular protein breakdown in stringent and relaxed strains of *E. coli*. *Cell* 2, 31-35.
- Rainey, P.B., Travisano, M., 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394, 69-72.
- Raivio, T.L., Silhavy, T.J., 1997. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *J. Bacteriol.* 179, 7724-7733.
- Reddy, P.S., Raghavan, A., Chatterji, D., 1995. Evidence for a ppGpp-binding site on *Escherichia coli* RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol. Microbiol.* 15, 255-265.
- Reece, R.J., Maxwell, A., 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26, 335-375.
- Reeh, S., Pedersen, S., Friesen, J.D., 1976. Biosynthetic regulation of individual proteins in *relA*<sup>+</sup> and *relA* strains of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *Mol. Gen. Genet.* 149, 279-289.
- Reeve, C.A., Amy, P.S., Matin, A., 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 160, 1041-1046.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K., Whittam, T.S., 2000. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* 406, 64-67.
- Reyes-Dominguez, Y., Contreras-Ferrat, G., Ramirez-Santos, J., Membrillo-Hernandez, J., Gomez- Eichelmann, M.C., 2003. Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol.* 185, 1097-1100.
- Reyrat, J.M., Pelicic, V., Gicquel, B., Rappuoli, R., 1998. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* 66, 4011-4017.
- Richter, D., 1976. The stringent control mechanism. Binding of uncharged tRNA and stringent factor to *Escherichia coli* ribosomes. *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago.)* 10, 85-91.
- Richter, D., 1980. Uncharged tRNA inhibits guanosine 3',5'-bis (diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase [ppGppase], the *spoT* gene product, from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 178, 325-327.
- Riehle, M.M., Bennett, A.F., Lenski, R.E., Long, A.D., 2003. Evolutionary changes in heat-inducible gene expression in lines of *Escherichia coli* adapted to high temperature. *Physiol Genomics* 14, 47-58.
- Riggs, D.L., Mueller, R.D., Kwan, H.S., Artz, S.W., 1986. Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 9333-9337.

- Rimsky,S., Zuber,F., Buckle,M., Buc,H., 2001. A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. *Mol. Microbiol.* 42, 1311-1323.
- Robbe-Saule,V., Algorta,G., Rouilhac,I., Norel,F., 2003. Characterization of the RpoS status of clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4352-4358.
- Robey,M., Benito,A., Hutson,R.H., Pascual,C., Park,S.F., Mackey,B.M., 2001. Variation in resistance to high hydrostatic pressure and *rpoS* heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4901-4907.
- Rodionov,D.G., Ishiguro,E.E., 1995. Direct correlation between overproduction of guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 4224-4229.
- Rodriguez,M.C., de Pedro,M.A., 1990. Initiation of growth in *pbpA*ts and *rodA*ts mutants of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 235-239.
- Romeis,T., Holtje,J.V., 1994. Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD-endopeptidase. *Eur. J. Biochem.* 224, 597-604.
- Rose,M., Charlesworth,B., 1980. A test of evolutionary theories of senescence. *Nature* 287, 141-142.
- Ross,W., Thompson,J.F., Newlands,J.T., Gourse,R.L., 1990. *E.coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* 9, 3733-3742.
- Rudd,K.E., Bochner,B.R., Cashel,M., Roth,J.R., 1985. Mutations in the *spoT* gene of *Salmonella typhimurium*: effects on *his* operon expression. *J. Bacteriol.* 163, 534-542.
- Ryals,J., Bremer,H., 1982. *relA*-dependent RNA polymerase activity in *E. coli*. *J. Bacteriol.* 150, 168-179.
- Sambrook J., Fitch E.F., Maniatis T. Molecular cloning. 1989. Cold Spring Harbor. Laboratory press, New York.
- Sands,M.K., Roberts,R.B., 1952. The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 63, 505-511.
- Santos,J.M., Lobo,M., Matos,A.P., de Pedro,M.A., Arraiano,C.M., 2002. The gene *bolA* regulates *dacA* (PBP5), *dacC* (PBP6) and *ampC* (AmpC), promoting normal morphology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45, 1729-1740.
- Sarubbi,E., Rudd,K.E., Xiao,H., Ikehara,K., Kalman,M., Cashel,M., 1989. Characterization of the *spoT* gene of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264, 15074-15082.
- Sato,A., Kobayashi,G., Hayashi,H., Yoshida,H., Wada,A., Maeda,M., Hiraga,S., Takeyasu,K., Wada,C., 2005. The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells* 10, 393-408.
- Schaechter,M., Maaloe,O., Kjeldgaard,N.O., 1958. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of *S. typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 19, 592-606.
- Scheffers,D.J., Pinho,M.G., 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 585-607.
- Schirmer,T., Keller,T.A., Wang,Y.F., Rosenbusch,J.P., 1995. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267, 512-514.
- Schneider,D., Duperchy,E., Coursange,E., Lenski,R.E., Blot,M., 2000a. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. IX. Characterization of insertion sequence-mediated mutations and rearrangements. *Genetics* 156, 477-488.
- Schneider,D., Duperchy,E., Depeyrot,J., Coursange,E., Lenski,R., Blot,M., 2002. Genomic comparisons among *E. coli* strains B, K-12, and O157:H7 using IS elements as molecular markers. *BMC. Microbiol.* 2, 18.
- Schneider,R., Travers,A., Kutateladze,T., Muskhelishvili,G., 1999. A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34, 953-964.
- Schneider,R., Travers,A., Muskhelishvili,G., 2000b. The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol.* 38, 167-175.
- Schreiber,G., Metzger,S., Aizenman,E., Roza,S., Cashel,M., Glaser,G., 1991. Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 3760-3767.
- Schroder,O., Wagner,R., 2000. The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J. Mol. Biol.* 298, 737-748.
- Scott,J.M., Ju,J., Mitchell,T., Haldenwang,W.G., 2000. The *Bacillus subtilis* GTP binding protein *obg* and regulators of the sigma(B) stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J. Bacteriol.* 182, 2771-2777.
- Seyfzadeh,M., Keener,J., Nomura,M., 1993. *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 11004-11008.

- Shaver,A.C., Dombrowski,P.G., Sweeney,J.Y., Treis,T., Zappala,R.M., Sniegowski,P.D., 2002. Fitness evolution and the rise of mutator alleles in experimental *E. coli* populations. *Genetics* 162, 557-566.
- Shen-Orr,S.S., Milo,R., Mangan,S., Alon,U., 2002. Network motifs in the transcriptional regulation network of *Escherichia coli*. *Nat. Genet.* 31, 64-68.
- Shiba,T., Tsutsumi,K., Yano,H., Ihara,Y., Kameda,A., Tanaka,K., Takahashi,H., Munekata,M., Rao,N.N., Kornberg,A., 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 11210-11215.
- Signoretto,C., Di Stefano,F., Canepari,P., 1996. Modified peptidoglycan chemical composition in shape-altered *Escherichia coli*. *Microbiology* 142 ( Pt 8), 1919-1926.
- Signoretto,C., Lleo,M.M., Canepari,P., 2002. Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Curr. Microbiol.* 44, 125-131.
- Simons,R.W., Houman,F., Kleckner,N., 1987. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53, 85-96.
- Sitnikov,D.M., Schineller,J.B., Baldwin,T.O., 1996. Control of cell division in *E. coli*: regulation of transcription of *ftsQA* involves both RpoS and SdiA-mediated autoinduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 336-341.
- Sniegowski,P.D., Gerrish,P.J., Lenski,R.E., 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 387, 703-705.
- Song,M., Kim,H.J., Kim,E.Y., Shin,M., Lee,H.C., Hong,Y., Rhee,J.H., Yoon,H., Ryu,S., Lim,S., Choy,H.E., 2004. ppGpp-dependent stationary phase induction of genes on *Salmonella pathogenicity* island 1. *J. Biol. Chem.* 279, 34183-34190.
- Spiers,A.J., Kahn,S.G., Bohannon,J., Travisano,M., Rainey,P.B., 2002. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics* 161, 33-46.
- Spira,B., Silberstein,N., Yagil,E., 1995. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol.* 177, 4053-4058.
- Spiro,S., Guest,J.R., 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 6, 399-428.
- Spratt,B.G., 1977. The mechanism of action of mecillinam. *J. Antimicrob. Chemother.* 3 Suppl B, 13-19.
- Spratt,B.G., Boyd,A., Stoker,N., 1980. Defective and plaque-forming lambda transducing bacteriophage carrying penicillin-binding protein-cell shape genes: genetic and physical mapping and identification of gene products from the *lip-dacA-rodA-pbpA-leuS* region of the *E. coli* chromosome. *J. Bacteriol.* 143, 569-581.
- Spratt,B.G., Pardee,A.B., 1975. Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature* 254, 516-517.
- St John,A.C., Conklin,K., Rosenthal,E., Goldberg,A.L., 1978. Further evidence for the involvement of charged tRNA and guanosine tetraphosphate in the control of protein degradation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 3945-3951.
- St John,A.C., Goldberg,A.L., 1978. Effects of reduced energy production on protein degradation, guanosine tetraphosphate, and RNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 253, 2705-2711.
- Steck,T.R., Franco,R.J., Wang,J.Y., Drlica,K., 1993. Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many *Escherichia coli* proteins. *Mol. Microbiol.* 10, 473-481.
- Stock,J.B., Ninfa,A.J., Stock,A.M., 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53, 450-490.
- Strunnikov,A.V., 2006. SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation. *Plasmid* 55, 135-144.
- Sucena,E., Delon,I., Jones,I., Payre,F., Stern,D.L., 2003. Regulatory evolution of *shavenbaby/ovo* underlies multiple cases of morphological parallelism. *Nature* 424, 935-938.
- Sugawara,E., Nikaido,H., 1992. Pore-forming activity of OmpA protein of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 2507-2511.
- Sugawara,T., Terai,Y., Imai,H., Turner,G.F., Koblmuller,S., Sturmbauer,C., Shichida,Y., Okada,N., 2005. Parallelism of amino acid changes at the RH1 affecting spectral sensitivity among deep-water cichlids from Lakes Tanganyika and Malawi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 5448-5453.
- Sullivan,K.H., Hegeman,G.D., Cordes,E.H., 1979. Alteration of the fatty acid composition of *Escherichia coli* by growth in the presence of normal alcohols. *J. Bacteriol.* 138, 133-138.
- Sun,Y.H., Bakshi,S., Chalmers,R., Tang,C.M., 2000. Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat. Med.* 6, 1269-1273.

- Sussman,A.J., Gilvarg,C., 1969. Protein turnover in amino acid-starved strains of *Escherichia coli* K-12 differing in their ribonucleic acid control. J. Biol. Chem. 244, 6304-6306.
- Sutton,A., Buencamino,R., Eisenstark,A., 2000. *rpoS* mutants in archival cultures of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. J. Bacteriol. 182, 4375-4379.
- Svitil,A.L., Cashel,M., Zyskind,J.W., 1993. Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis *in vivo*. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 268, 2307-2311.
- Swanson,M.S., Hammer,B.K., 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annu. Rev. Microbiol. 54, 567-613.
- Sy,J., 1980. Activation of ppGpp-3'-pyrophosphohydrolase by a supernatant factor and ATP. J. Biol. Chem. 255, 10056-10059.
- Takahashi,K., Kasai,K., Ochi,K., 2004. Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 101, 4320-4324.
- Tamaki,S., Matsuzawa,H., Matsuhashi,M., 1980. Cluster of *mrdA* and *mrdB* genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 141, 52-57.
- Tani,T.H., Khodursky,A., Blumenthal,R.M., Brown,P.O., Matthews,R.G., 2002. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99, 13471-13476.
- Tao,H., Bausch,C., Richmond,C., Blattner,F.R., Conway,T., 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. J. Bacteriol. 181, 6425-6440.
- Taylor,C.M., Beresford,M., Epton,H.A., Sigee,D.C., Shama,G., Andrew,P.W., Roberts,I.S., 2002. *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. J. Bacteriol. 184, 621-628.
- Taylor,F., Cronan,J.E., Jr., 1976. Selection and properties of *Escherichia coli* mutants defective in the synthesis of cyclopropane fatty acids. J. Bacteriol. 125, 518-523.
- Taylor,R.K., Hall,M.N., Enquist,L., Silhavy,T.J., 1981. Identification of OmpR: a positive regulatory protein controlling expression of the major outer membrane matrix porin proteins of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 147, 255-258.
- Templin,M.F., Ursinus,A., Holtje,J.V., 1999. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. EMBO J. 18, 4108-4117.
- Tenaillon,O., Denamur,E., Matic,I., 2004. Evolutionary significance of stress-induced mutagenesis in bacteria. Trends Microbiol. 12, 264-270.
- Tendeng,C., Bertin,P.N., 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. Trends Microbiol. 11, 511-518.
- Tetu,C., Dassa,E., Boquet,P.L., 1980. The energy-dependent degradation of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate in *Escherichia coli*. Lack of correlation with ATP levels *in vivo* and role of the transmembrane proton gradient. Eur. J. Biochem. 103, 117-124.
- Toone,W.M., Rudd,K.E., Friesen,J.D., 1991. *deaD*, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. J. Bacteriol. 173, 3291-3302.
- Touloukhonov,I.I., Shulgina,I., Hernandez,V.J., 2001. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. J. Biol. Chem. 276, 1220-1225.
- Trach,K., Hoch,J.A., 1989. The *Bacillus subtilis spo0B* stage 0 sporulation operon encodes an essential GTP-binding protein. J. Bacteriol. 171, 1362-1371.
- Travers,A., Muskhelishvili,G., 2005. DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? Nat. Rev. Microbiol. 3, 157-169.
- Travers,A.A., 1980. Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. J. Bacteriol. 141, 973-976.
- Travers,A.A., 1984. Conserved features of coordinately regulated *E. coli* promoters. Nucleic Acids Res. 12, 2605-2618.
- Traxler,M.F., Chang,D.E., Conway,T., 2006. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glucose-lactose diauxie in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103, 2374-2379.
- Tsui,P., Helu,V., Freundlich,M., 1988. Altered osmoregulation of *ompF* in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 4950-4953.
- Tuomanen,E., Markiewicz,Z., Tomasz,A., 1988. Autolysis-resistant peptidoglycan of anomalous composition in amino-acid-starved *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170, 1373-1376.

- Uzan,M., Danchin,A., 1978. Correlation between the serine sensitivity and the derepressibility of the *ilv* genes in *Escherichia coli relA*- mutants. Mol. Gen. Genet. 165, 21-30.
- Valens,M., Penaud,S., Rossignol,M., Cornet,F., Boccard,F., 2004. Macrodome organization of the *Escherichia coli* chromosome. EMBO J. 23, 4330-4341.
- Van Delden,C., Comte,R., Bally,A.M., 2001. Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 183, 5376-5384.
- Van der Biezen,E.A., Sun,J., Coleman,M.J., Bibb,M.J., Jones,J.D., 2000. Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 3747-3752.
- Van der Linden,M.P., de Haan,L., Hoyer,M.A., Keck,W., 1992. Possible role of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 6 in stabilization of stationary-phase peptidoglycan. J. Bacteriol. 174, 7572-7578.
- Van der Meide,P.H., Vijgenboom,E., Dicke,M., Bosch,L., 1982. Regulation of the expression of *tufA* and *tufB*, the two genes coding for the elongation factor EF-Tu in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 139, 325-330.
- Van Heijenoort,J., 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology 11, 25R-36R.
- Vanden Boom,T., Cronan,J.E., Jr., 1989. Genetics and regulation of bacterial lipid metabolism. Annu. Rev. Microbiol. 43, 317-343.
- Vanderwel,D., Ishiguro,E.E., 1984. Properties of cell wall peptidoglycan synthesized by amino acid deprived *relA* mutants of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 30, 1239-1246.
- Vasi,F.M.T. and R.E.Lenski. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. II. Changes in life-history traits during adaptation to a seasonal environment. American Naturalist 144, 432-456. 1994.
- Venetianer,P., 1968. Preferential synthesis of the messenger RNA of the histidine operon during histidine starvation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 959-963.
- Venetianer,P., 1969. Level of messenger RNA transcribed from the histidine operon in repressed, derepressed and histidine-starved *Salmonella typhimurium*. J. Mol. Biol. 45, 375-384.
- Vidal,O., Longin,R., Prigent-Combaret,C., Dorel,C., Hooreman,M., Lejeune,P., 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. J. Bacteriol. 180, 2442-2449.
- Villadsen,I.S., Michelsen,O., 1977. Regulation of PRPP and nucleoside tri and tetraphosphate pools in *Escherichia coli* under conditions of nitrogen starvation. J. Bacteriol. 130, 136-143.
- Vinella,D., Albrecht,C., Cashel,M., D'Ari,R., 2005. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 56, 958-970.
- Vinella,D., Cashel,M., D'Ari,R., 2000. Selected amplification of the cell division genes *ftsQ*-*ftsA*-*ftsZ* in *Escherichia coli*. Genetics 156, 1483-1492.
- Vinella,D., D'Ari,R., Jaffe,A., Boulloc,P., 1992. Penicillin binding protein 2 is dispensable in *Escherichia coli* when ppGpp synthesis is induced. EMBO J. 11, 1493-1501.
- Vinella,D., Gagny,B., Joseleau-Petit,D., D'Ari,R., Cashel,M., 1996. Mecillinam resistance in *Escherichia coli* is conferred by loss of a second activity of the AroK protein. J. Bacteriol. 178, 3818-3828.
- Vinella,D., Joseleau-Petit,D., Thevenet,D., Boulloc,P., D'Ari,R., 1993. Penicillin-binding protein 2 inactivation in *Escherichia coli* results in cell division inhibition, which is relieved by FtsZ overexpression. J. Bacteriol. 175, 6704-6710.
- Vogel,H., Jahnig,F., 1986. Models for the structure of outer-membrane proteins of *Escherichia coli* derived from raman spectroscopy and prediction methods. J. Mol. Biol. 190, 191-199.
- Vollmer,W., von Rechenberg,M., Holtje,J.V., 1999. Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 274, 6726-6734.
- von Rechenberg,M., Ursinus,A., Holtje,J.V., 1996. Affinity chromatography as a means to study multienzyme complexes involved in murein synthesis. Microb. Drug Resist. 2, 155-157.
- Votsch,W., Templin,M.F., 2000. Characterization of a beta -N-acetylglucosaminidase of *E. coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and beta -lactamase induction. J. Biol. Chem. 275, 39032-39038.
- Vulic,M., Kolter,R., 2002. Alcohol-induced delay of viability loss in stationary-phase cultures of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 184, 2898-2905.
- Wada,A., Mikkola,R., Kurland,C.G., Ishihama,A., 2000. Growth phase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182, 2893-2899.

- Wada,A., Yamazaki,Y., Fujita,N., Ishihama,A., 1990. Structure and probable genetic location of a "ribosome modulation factor" associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 87, 2657-2661.
- Wang,L., Khattar,M.K., Donachie,W.D., Lutkenhaus,J., 1998. FtsI and FtsW are localized to the septum in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180, 2810-2816.
- Wang,X., Huang,J., Mukherjee,A., Cao,C., Lutkenhaus,J., 1997. Analysis of the interaction of FtsZ with itself, GTP, and FtsA. J. Bacteriol. 179, 5551-5559.
- Webb,C., Moreno,M., Wilmes-Riesenberg,M., Curtiss,R., III, Foster,J.W., 1999. Effects of DksA and ClpP protease on sigma S production and virulence in *Salmonella typhimurium*. Mol. Microbiol. 34, 112-123.
- Weinstein-Fischer,D., Elgrably-Weiss,M., Altuvia,S., 2000. *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. Mol. Microbiol. 35, 1413-1420.
- Weiss,D.S., Chen,J.C., Ghigo,J.M., Boyd,D., Beckwith,J., 1999. Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. J. Bacteriol. 181, 508-520.
- Wells,D.H., Long,S.R., 2002. The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. Mol. Microbiol. 43, 1115-1127.
- Wells,D.H., Long,S.R., 2003. Mutations in *rpoBC* suppress the defects of a *Sinorhizobium meliloti* *relA* mutant. J. Bacteriol. 185, 5602-5610.
- Wensink,J., Gilden,N., Witholt,B., 1982. Attachment of lipoprotein to the murein of *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 122, 587-590.
- Westerhoff,H.V., O'Dea,M.H., Maxwell,A., Gellert,M., 1988. DNA supercoiling by DNA gyrase. A static head analysis. Cell Biophys. 12, 157-181.
- Williams,M.G., Rogers,P., 1987. Expression of *arg* genes of *Escherichia coli* during arginine limitation dependent upon stringent control of translation. J. Bacteriol. 169, 1644-1650.
- Wolf,Y.I., Aravind,L., Grishin,N.V., Koonin,E.V., 1999. Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. Genome Res. 9, 689-710.
- Woods,R., Schneider,D., Winkworth,C.L., Riley,M.A., Lenski,R.E., 2006. Tests of parallel molecular evolution in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103, 9107-9112.
- Wout,P., Pu,K., Sullivan,S.M., Reese,V., Zhou,S., Lin,B., Maddock,J.R., 2004. The *Escherichia coli* GTPase CgtAE cofractionates with the 50S ribosomal subunit and interacts with SpoT, a ppGpp synthetase/hydrolase. J. Bacteriol. 186, 5249-5257.
- Wu,L.J., Errington,J., 2002. A large dispersed chromosomal region required for chromosome segregation in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. EMBO J. 21, 4001-4011.
- Xiao,H., Kalman,M., Ikehara,K., Zemel,S., Glaser,G., Cashel,M., 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. J. Biol. Chem. 266, 5980-5990.
- Xu,J., Johnson,R.C., 1995. Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodule growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177, 938-947.
- Yakunin,A.F., Proudfoot,M., Kuznetsova,E., Savchenko,A., Brown,G., Arrowsmith,C.H., Edwards,A.M., 2004. The HD domain of the *Escherichia coli* tRNA nucleotidyltransferase has 2',3'-cyclic phosphodiesterase, 2'-nucleotidase, and phosphatase activities. J. Biol. Chem. 279, 36819-36827.
- Yamada,H., Muramatsu,S., Mizuno,T., 1990. An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA. J. Biochem. (Tokyo) 108, 420-425.
- Yamada,H., Yoshida,T., Tanaka,K., Sasakawa,C., Mizuno,T., 1991. Molecular analysis of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences. Mol. Gen. Genet. 230, 332-336.
- Yamagishi,M., Matsushima,H., Wada,A., Sakagami,M., Fujita,N., Ishihama,A., 1993. Regulation of the *Escherichia coli* *rmf* gene encoding the ribosome modulation factor: growth phase- and growth rate-dependent control. EMBO J. 12, 625-630.
- Yem,D.W., Wu,H.C., 1976. Isolation of *Escherichia coli* K-12 mutants with altered level of beta-N-acetylglucosaminidase. J. Bacteriol. 125, 372-373.
- Yim,H.H., Brems,R.L., Villarejo,M., 1994. Molecular characterization of the promoter of *osmY*, an *rpoS*-dependent gene. J. Bacteriol. 176, 100-107.
- Yu,D., Ellis,H.M., Lee,E.C., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Court DL, 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 5978-5983.



- Zacharias,M., Goringe,H.U., Wagner,R., 1989. Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and *tac* promoter on growth-rate control and stringent sensitivity. *EMBO J.* 8, 3357-3363.
- Zambrano,M.M., Kolter,R., 1996. GASping for life in stationary phase. *Cell* 86, 181-184.
- Zambrano,M.M., Siegele,D.A., Almiron,M., Tormo,A., Kolter,R., 1993. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259, 1757-1760.
- Zechiedrich,E.L., Khodursky,A.B., Bachellier,S., Schneider,R., Chen,D., Lilley,D.M., Cozzarelli,N.R., 2000. Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 8103-8113.
- Zhang,S., Haldenwang,W.G., 2004. Guanine nucleotides stabilize the binding of *Bacillus subtilis* Ogb to ribosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 565-569.
- Zhang,X., Bremer,H., 1996. Effects of Fis on ribosome synthesis and activity and on rRNA promoter activities in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 259, 27-40.
- Zhang,X., Dennis,P., Ehrenberg,M., Bremer,H., 2002. Kinetic properties of *rrn* promoters in *Escherichia coli*. *Biochimie* 84, 981-996.
- Zhao,G., Ceci,P., Ilari,A., Giangiacomo,L., Laue,T.M., Chiancone,E., Chasteen,N.D., 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 277, 27689-27696.
- Zheng,M., Wang,X., Templeton,L.J., Smulski,D.R., LaRossa,R.A., Storz,G., 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *E. coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562-4570.
- Zhi,H., Wang,X., Cabrera,J.E., Johnson,R.C., Jin,D.J., 2003. Fis stabilizes the interaction between RNA polymerase and the ribosomal promoter *rrnB* P1, leading to transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 278, 47340-47349.
- Zhou,Y.N., Jin,D.J., 1998. The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like "stringent" RNA polymerases in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2908-2913.
- Zidwick,M.J., Korshus,J., Rogers,P., 1984. Positive control of expression of the *argECBH* gene cluster in vitro by guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate. *J. Bacteriol.* 159, 647-651.
- Zielke,R., Sikora,A., Dutkiewicz,R., Wegrzyn,G., Czyz,A., 2003. Involvement of the *cgtA* gene function in stimulation of DNA repair in *Escherichia coli* and *Vibrio harveyi*. *Microbiology* 149, 1763-1770.
- Zinser,E.R., Kolter,R., 1999. Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *J. Bacteriol.* 181, 5800-5807.
- Zinser,E.R., Kolter,R., 2000. Prolonged stationary-phase incubation selects for *lrp* mutations in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 182, 4361-4365.
- Zinser,E.R., Kolter,R., 2004. *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Res. Microbiol.* 155, 328-336.
- Zinser,E.R., Schneider,D., Blot,M., Kolter,R., 2003. Bacterial evolution through the selective loss of beneficial Genes. Trade-offs in expression involving two loci. *Genetics* 164, 1271-1277.

## Résumé

---

Les mécanismes d'adaptation d'*Escherichia coli* à une alternance entre conditions de croissance et de carence ont été étudiés par une stratégie d'évolution expérimentale initiée par Richard Lenski en 1988. Douze populations indépendantes d'*E. coli*, dérivant d'un ancêtre commun, ont été propagées pendant plus de 40 000 générations par transferts journaliers dans un milieu minimum contenant une quantité limitante de glucose. Tous les jours, les 12 populations rencontrent une phase de latence, suivie d'une phase de croissance exponentielle, puis d'une phase stationnaire. L'évolution de ces populations se caractérise par un fort degré de parallélisme phénotypique. Leur fitness et leur volume cellulaire augmente, tandis que leur spectre de capacités métaboliques diminue. D'autre part, ce parallélisme phénotypique est également visible au niveau de l'expression globale des gènes. Au cours de ce travail, nous avons pu également mettre en évidence une augmentation parallèle de superhélicité de l'ADN. L'étude moléculaire des modifications phénotypiques parallèles a permis l'identification de mutations bénéfiques situées dans l'opéron *rbs*, impliqué dans le catabolisme du ribose, le gène *malT*, codant un régulateur des gènes d'utilisation du maltose, et *spoT*, codant un acteur majeur du métabolisme de (p)ppGpp, l'effecteur de la réponse stringente. Ces mutations n'expliquent qu'une faible partie de l'augmentation de fitness observée à 20 000 générations. **L'objectif de ces travaux consiste à identifier d'autres mutations bénéfiques, et à en caractériser certaines au niveau moléculaire afin de comprendre les bases de l'adaptation des bactéries à leur environnement.**

Au cours de ce travail, deux types de mutations bénéfiques ont été identifiées, ciblant l'opéron *pbpA-rodA*, impliqué dans la biosynthèse de la paroi, et les gènes *topA* et *fis*, impliqués dans la régulation de la superhélicité de l'ADN. Les mêmes gènes sont les cibles de la sélection naturelle dans la majorité voire la totalité des 12 populations. L'évolution phénotypique parallèle est donc associée à un fort degré de parallélisme génétique.

Les effets moléculaires de deux mutations touchant la région promotrice de *pbpA-rodA* ainsi que de trois mutations dans la partie 3' du gène *spoT*, correspondant au domaine C-terminal de fonction inconnue de la protéine SpoT, ont été analysés. Nous avons démontré que les différentes mutations d'un même gène ont des effets moléculaires similaires au cours de l'évolution. Les deux mutations *pbpA-rodA* diminuent la quantité de protéine PBP2, modifiant la morphologie cellulaire et favorisant la synthèse de peptidoglycane au niveau du septum. Les trois mutations *spoT* ne modifient pas les niveaux cellulaires de (p)ppGpp, mais atténuent le contrôle stringent lors de l'entrée des bactéries en phase stationnaire. Nous avons également montré l'implication du domaine C-terminal de SpoT dans des interactions protéine-protéine avec ACP, impliquée dans le métabolisme des lipides. Les différentes mutations pourraient atténuer les transitions croissance-carence, en bloquant les cellules dans un état physiologique adapté aux conditions de croissance.

L'adaptation des 12 populations au cours de l'évolution expérimentale est caractérisée par une évolution phénotypique, génétique et moléculaire parallèle. Près de la moitié des mutations bénéfiques affectent les réseaux de régulation globale de l'expression des gènes, notamment des gènes « hubs », codant des régulateurs globaux (*spoT*, *fis*, *topA*). La plasticité des réseaux de régulation globale, ici la réponse stringente et la topologie de l'ADN, joue donc un rôle primordial au cours de l'évolution et l'adaptation des bactéries. Nous suggérons que la complexité et la plasticité des réseaux de régulation ont été sélectionnées au cours de l'évolution, car elles favorisent l'adaptabilité des bactéries.