

Remerciements

En préambule de cette thèse, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, permis à ce travail d'aboutir.

Je remercie tout d'abord mon promoteur, le Docteur Mohammed Terrak ainsi que mon co-promoteur, le Docteur Frédéric Kerff pour m'avoir permis de présenter le FRIA et d'intégrer le Centre d'Ingénierie des protéines (CIP) de l'université de Liège.

Je remercie le Professeur Denis Baurain d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je le remercie pour sa disponibilité et sa bienveillance durant les étapes de cette défense. Je remercie les Docteurs Xavier De Bolle, Nienke Buddelmeijer, Adeline Derouaux et Georges Feller d'avoir accepté d'être membre du Jury de thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail ainsi que pour vos corrections et remarques constructives.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant ce travail notamment, l'équipe de l'université de Newcastle et particulièrement le Professeur Waldemar Vollmer et le Docteur Alexander Egan pour leur disponibilité, les analyses HPLC, leur aide ainsi que pour nos échanges lors des congrès.

Un grand merci à l'équipe de l'institut de biologie structurale de Grenoble notamment le Docteur Jean-Pierre Simorre et le Docteur Catherine Bougault pour les expériences RMN.

Je remercie Raphaël Herman pour son aide en cristallographie lors de mes premiers pas dans le laboratoire du Mosquito ainsi que pour la sélection et le montage des cristaux. Ton humour me manque déjà !

Je remercie le Docteur Georges Feller pour sa disponibilité, sa confiance, sa sympathie et son soutien tout au long de cette thèse.

Un grand merci au Docteur Colette Duez d'avoir partagé avec moi sa précieuse expérience. Je la remercie aussi pour son soutien, ses encouragements ainsi que pour ses conseils avisés. Je te remercie aussi d'avoir tenter de pallier mes lacunes en orthographe ! Je pense malheureusement que malgré mes efforts, c'est incurable !!!

Je remercie Fabienne, Caro et Iris qui constituent l'équipe de charme qui permet à l'unité de fonctionner. Je les remercie pour leur amitié, leur gentillesse, leur disponibilité et leur travail. A mes cannetons compétents Alexis, Tom et Alisson, merci pour votre engagement dans notre collaboration, cette thèse n'aurait pas été la même sans votre labeur.

Un merci tout particulier, au Docteur Adeline Derouaux qui m'a accompagné dans toutes les étapes de ma carrière académique du stage de premier Master jusqu'à mon jury de thèse. Je la remercie de m'avoir donné goût à la recherche scientifique et de m'y avoir correctement formée. Un grand merci à toi Adeline pour ta disponibilité, tes conseils, ton soutien, ta gentillesse et ton sourire. Merci, de m'avoir toujours poussé plus loin notamment au travers de tes corrections détaillées.

Aux membres du gang du 1.28, anciens ou présents, merci pour tous ces jolis moments passés ensemble que ce soit nos innombrables fous rires ou nos débats scientifiques. J'espère qu'Adrien fera prospérer cette ambiance qui caractérise le 1.28. A Nicolas et Mathieu avec qui j'ai commencé, mes premiers compagnons de bureau, merci pour votre patience et nos traditionnels brainstorming. Merci à Isma, Samir et Adrien pour tous nos moments partagés autour d'une paillasse, d'un café, d'une bière jus de fruit, d'un kayak ou d'une piste de danse ! Adrien, le prochain à passer le cap, je te souhaite bon vent et de la réussite pour la suite (mais je ne m'inquiète pas).

Je remercie tous les membres du CIP pour leur sympathie et leur disponibilité. Un grand merci aux techniciens, doctorants et post-doctorants avec qui j'ai pris plaisir à collaborer au quotidien au travers d'entraides et d'échanges scientifiques ; Merci à Marjorie, Meryem, Simona, Sarah, Madeleine, Alice, Oli, François, Alex, Patricia, Patrick, Julie et tous les autres. Je remercie les VALBIO pour leur aide et leurs encouragements.

Je remercie chaleureusement ces collègues devenus des amis pour leurs encouragements et leur aide durant les dernières étapes de ce travail. Je pense évidemment à Meryem, Alex, petite Caro, Marjorie, Madeleine, François, Sarah et ma compagne de rédaction Simona ! A mes amis, Bouchon et Minou merci pour votre soutien et vos petits coups de pouces dans cette dernière ligne droite. Merci à toi Bouchon pour ton perpétuel optimisme ainsi que pour la confiance que tu me portes. Merci de toujours me suivre dans mes aventures !

Merci à toi Max pour avoir supporté ces années de thèse ou m'avoir supporté pendant ces années de thèse..... Merci de me laisser accomplir mes ambitions professionnelles et de t'occuper, si bien, de notre petite Peyton.

Merci à mes proches d'avoir toujours cru en moi et m'avoir fait confiance. Merci à toi marraine d'être mon spectateur le plus fidèle !
Merci à mes frères Djamal, Martin et Joffrey ainsi qu'à ma sœur Sarah pour votre soutien et la confiance que vous avez toujours placée en moi. J'espère en être toujours à la hauteur et je suis fière de vous !

Pour terminer, je voudrais dédier cette thèse à mes grands Parents Claudy et Marcelle. Je les remercie de m'avoir donné la confiance et les valeurs nécessaires pour devenir la personne que je suis. Merci d'avoir toujours été là pour moi, pour votre aide, pour vos conseils ainsi que pour votre confiance indéfectible. Merci Papy et Mamy.

Merci

Abréviations

a. a	<u>A</u> cide <u>a</u> miné
ABC	<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette
APS	<u>P</u> ersulfate d' <u>a</u> mmonium
BCA	<u>B</u> icinchoninic acid <u>a</u> ssay
C55-P	Undécaprényl <u>p</u> hosphate
CCTP	<u>C</u> onserved <u>C</u> -terminal <u>p</u> eptide
CPase	<u>C</u> arboxypeptid <u>a</u> se
DDM	N- <u>d</u> odécyl- β -D- <u>m</u> altopyranoside
DMSO	<u>D</u> iméthyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> ide
Ecase	<u>E</u> ndopeptid <u>a</u> se
FRET	<u>F</u> örster <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer
Fts	<u>F</u> ilamentation <u>t</u> emperature <u>s</u> ensitive
GlcNAc	<u>N</u> - <u>a</u> cétyl <u>g</u> lucosamine
GTase	<u>G</u> lycosyl <u>t</u> ransférase
HA	<u>H</u> émaglutamine
HP	<u>H</u> aute <u>P</u> erformance
HPLC	<u>H</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
IMAC	<u>I</u> mmobilized <u>m</u> etal <u>a</u> ffinity <u>c</u> hromatography
IPTG	<u>I</u> sopropyl- β -D- <u>t</u> hiogalactopyranoside
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LMNG	<u>L</u> auryl <u>M</u> altose <u>N</u> éopentyl <u>G</u> lycol
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharides
MatP	<u>M</u> acrodomaine <u>t</u> er <u>p</u> rotéines
MCS	<u>S</u> ite de <u>c</u> lonage <u>m</u> ultiple
Méso-A2pm	<u>m</u> éso- <u>d</u> iaminopimélique
MOP	<u>M</u> ultidrug/ <u>o</u> ligo-saccharidyl-lipid/ <u>p</u> olysaccharide
MTG	<u>T</u> ransglycosylase <u>m</u> onofonctionnelle
MurNAc	<u>A</u> cide <u>N</u> - <u>a</u> cétyl <u>m</u> uramique

MurNAcAnh	1,6- an hydroMurNAc
NBD	N itro b enzoxa d iazole
NO	O cclusion N ucléoïde
OST	O ligo s accharyl t ransférase
PAGE	P oly a crylamide gel e lectrophoresis
PBP	P enicillin- b inding p rotein
PCR	R éaction de p olymerisation en c haîne
PG	P eptidoglycane
RBS	R ibosome B inding S ite
RMN	R ésonance M agnétique N ucléaire
SDS	D odécyl S ulfate de S odium
SEDS	S hape, E longation, D ivision and S porulation
SOC	S uper O ptimal broth with C atabolite repression
SPOR	SPOR ulation related domain
TAE	T ris- a cétate, 2Mm E DTA
Tat	T win- a rginine t ranslocation
TB	T errific B roth
TBS	T ris b uffer s aline
TEMED	T étra m éthyl é thylène d iamine
TEV	T obacco E tch V irus
TGS	T ris- G lycine- S DS
TLC	T hin- l ayer c hromatography
TIRFM	T otal i nternal r eflection f luorescence m icroscopy
TM	S egment t ransmembranaire
TPase	T rans p eptidase
TTBS	T win Tris b uffer s aline
UDP	U ridine d iphosphate

Table des matières

I.	Introduction.....	1
1.	La paroi bactérienne.....	2
1.1.	Le peptidoglycane	3
1.1.1.	Composition chimique du peptidoglycane.....	4
1.1.1.1.	Variabilité des chaînes de glycanes.....	4
1.1.1.2.	Variabilité de la partie peptidique.....	6
1.1.2.	Biosynthèse du peptidoglycane	8
1.1.2.1.	Phase cytoplasmique : synthèse des précurseurs solubles.....	8
1.1.2.2.	Phase membranaire : biosynthèse du lipide I et II.....	9
1.1.2.3.	Phase périplasmique : polymérisation.....	9
1.1.2.3.1.	La réaction de transglycolysation.....	9
1.1.2.3.2.	Réaction de transpeptidation.....	10
1.1.3.	Les « Penicillin-Binding Proteins » ou PBPs.....	11
1.1.4.	Remodelage et recyclage du PG.....	13
1.1.4.1.	Les hydrolases du PG.....	13
1.1.4.1.1.	Les <i>N</i> -acétylglucosaminidases.....	13
1.1.4.1.2.	Les muramidases.....	14
1.1.4.1.3.	Les endopeptidases et carboxypeptidases	14
1.1.4.1.4.	Les <i>N</i> -Acétylmuramyl-L-Alanine amidases	15
1.1.4.2.	Recyclage du PG	16
1.1.5.	Synthèse du PG au cours du cycle cellulaire	18
1.1.5.1.	Complexes de synthèse du peptidoglycane durant l'élongation et la division cellulaire.....	19
1.1.5.2.	Le modèle 3 pour 1.....	21
1.1.5.3.	Régulation de la synthèse du peptidoglycane.....	22
1.1.5.4.	Synthèse du peptidoglycane et formes bactériennes.....	23
1.1.6.	Identité de la flippase de lipide II et rôle des protéines SEDS.....	27
1.1.6.1.	Identité de la flippase du lipide II.....	28
1.1.6.2.	Activité glycosyltransférase des protéines SEDS.....	29
1.1.6.3.	Un modèle en deux complexes de synthèses	30
2.	La division chez <i>E. coli</i>	32
2.1.	Généralités	32
2.2.	Formation de l'anneau FtsZ.....	33

2.2.1.	Ancrage dans la membrane de l'anneau-Z.....	35
2.2.2.	Stabilisation de l'anneau-Z, les protéines Zaps	35
2.2.3.	Rôles de l'anneau-Z	36
2.2.4.	Localisation de FtsZ au niveau du site de division.....	37
2.2.4.1.	Occlusion du nucléoïde	38
2.2.4.2.	Système Min.....	38
2.2.4.3.	« Liaison Ter ».....	39
2.2.5.	FtsEX	40
2.3.	Maturation du divisome	41
2.3.1.	FtsK	41
2.3.2.	FtsQLB.....	41
2.3.3.	FtsW.....	42
2.3.4.	PBP3.....	43
2.3.5.	FtsN.....	44
2.4.	Invagination de la membrane externe	46
2.5.	Hydrolyse du peptidoglycane septal et séparation des cellules filles	48
2.5.1.	AmiA, AmiB et AmiC.....	48
2.5.2.	Les facteurs LytM	50
II.	Objectifs	55
III.	Matériel et Méthodes	59
1.	Matériel.....	60
1.1.	Souches bactériennes.....	60
1.2.	Plasmides.....	61
1.3.	Oligonucléotides.....	61
1.4.	Milieus	62
1.5.	Antibiotiques	62
1.6.	Détergents.....	63
1.7.	Réactifs	63
1.8.	Enzymes.....	64
1.9.	Solutions et tampons.....	65
1.10.	Divers.....	69
1.10.1.	Marqueurs de taille	69
1.10.1.1.	Marqueur de taille pour l'ADN.....	69
1.10.1.2.	Marqueur de taille pour les protéines	69

1.10.1.3.	Marqueur de taille pour les Western Blots	70
2.	Méthode.....	71
2.1.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	71
2.1.1.	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase.....	71
2.1.2.	PrimeSTAR® HS DNA Polymerase.....	71
2.2.	Electrophorèse sur gel d'agarose	71
2.3.	Purification de l'ADN	72
2.4.	Digestion enzymatique.....	72
2.5.	Clonage des fragments d'ADN.....	72
2.6.	Oligonucleotide annealing.....	72
2.7.	Cellules compétentes et transformation.....	72
2.7.1.	Préparation de cellules « ultra-compétentes » par la Méthode Inoue.....	72
2.7.2.	Transformation des cellules d'E. coli.....	73
2.8.	Purification de l'ADN plasmidique.....	73
2.9.	Dosage de l'ADN.....	73
2.10.	Séquençage	73
2.11.	Mutagenèse dirigée du domaine AMIN	74
2.12.	Construction du vecteur de localisation du domaine AMIN	75
2.13.	Production et purification des protéines d'intérêt	76
2.13.1.	Production des protéines ou des complexes membranaires.....	76
2.13.2.	Préparation des membranes	77
2.13.3.	Préparation des protéines et complexes d'intérêt	77
2.13.4.	Purification des protéines et complexes d'intérêt	78
2.13.5.	Production d'AmiC, du domaine LytM, du domaine AMIN et de ses mutants	78
2.13.6.	Purification d'AmiC, du domaine LytM, du domaine AMIN et de ses mutants	79
2.13.7.	Production en milieu minimum d'AmiC et du domaine AMIN	79
2.13.8.	Purification par chromatographie d'exclusion de taille	80
2.13.9.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).....	80
2.14.	Analyse des polymères de glycane par SDS-PAGE.	80
2.14.1.	Préparation des échantillons.....	80
2.14.2.	Gel de séparation	81
2.14.3.	Analyse de l'interaction lipide II-FtsW.....	81
2.15.	Analyse de l'interaction lipide II-protéine par Native-PAGE	81
2.16.	Tests d'activité GTase en fluorescence continue	81

2.17.	Analyse de l'activité GTase par chromatographie sur couche mince (TLC)	82
2.17.1.	Préparation des échantillons.....	82
2.18.	Analyse HPLC des produits de réaction de synthèse du peptidoglycane in vitro	83
2.19.	Western blot.....	83
2.20.	Production et purification du peptidoglycane	84
2.21.	Test in vitro de liaison au peptidoglycane.....	84
2.22.	Analyse par RMN de l'interaction AMIN-peptidoglycane	84
2.23.	Cristallisation du domaine LytM de NlpD.....	85
IV.	Résultats.....	87
1.	Chapitre 1 : synthèse du peptidoglycane	88
1.1.	Expression et purification des complexes membranaires d'intérêt.....	88
1.1.1.	Production et purification du complexe FtsW-PBP3.....	88
1.1.2.	Production et purification des complexes FtsW-PBP1b et PBP1b-PBP3.....	89
1.1.3.	Production et purification du complexe FtsW-PBP3-PBP1b.	91
1.2.	Rôle de la boucle 7/8 de FtsW dans son interaction avec PBP3	92
1.2.1.	Résumé des résultats de co-expression	95
1.3.	Activité et régulation de la synthèse du peptidoglycane.	95
1.4.	Interaction entre FtsW et le lipide II et régulation par PBP3	99
1.5.	Activité glycosyltransférase des protéines SEDS.....	101
1.6.	Effet de MurJ sur le lipide II et sa polymérisation par PBP1b.	102
2.	Chapitre 2 : hydrolyse du peptidoglycane septal	104
2.1.	Etude de la localisation de l'amidase AmiC au site de division, via son domaine AMIN	104
2.1.1.	Etude de l'interaction entre AmiC et le peptidoglycane par RMN.....	104
2.1.1.1.	Attribution des résonances du domaine AMIN.....	106
2.1.1.2.	Etude de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane	107
2.1.2.	Modèle bio-informatique de l'interaction du domaine AMIN avec le peptidoglycane.	110
2.1.3.	Identification par mutagenèse dirigée des résidus impliqués dans la localisation du domaine AMIN.	111
2.1.3.1.	Caractérisation des mutants du domaine AMIN par co-précipitation avec le peptidoglycane.....	113
2.1.3.2.	Localisation par fluorescence des domaines AMIN mutés au site de division. ..	115
2.1.3.3.	Tableau des mutations du domaine AMIN et résultats des purifications et caractérisation des protéines mutées.....	116
2.2.	Etude de la régulation de l'amidase AmiC par le domaine LytM de NlpD	117

V.	Discussion.....	121
1.	Chapitre 1 : synthèse du peptidoglycane.....	122
1.1.	Formation d'un complexe ternaire entre FtsW, PBP3 et PBP1b.....	122
1.2.	PBP3 module l'interaction entre FtsW et le lipide II	123
1.3.	Relation entre FtsW, MurJ et le lipide II.....	124
1.4.	Modèle de la régulation de l'activité de FtsW par PBP3	124
2.	Chapitre 2 : Hydrolyse du peptidoglycane septal.....	126
VI.	Bibliographie.....	129
VII.	Annexes	151

Table des figures

FIGURE I.1 : Les différents types de parois.....	3
FIGURE I.2 : Le sacculus.....	4
FIGURE I.3 : Modifications des chaînes de glycanes du peptidoglycane.....	5
FIGURE I.4 : Variabilité des liaisons peptidiques du peptidoglycane	7
FIGURE I.5 : Etapes cytoplasmiques de la biosynthèse du peptidoglycane	8
FIGURE I.6. Mécanisme de la réaction de transglycolysation.....	10
FIGURE I.7. Mécanisme de la réaction de DD-transpeptidation	10
FIGURE I.8 : Clivage du lien glycosidique dans le peptidoglycane.....	14
FIGURE I.9 : Hydrolyse des liaisons amides ou peptidiques du peptidoglycane.....	16
FIGURE I.10 : Voie de recyclage du tripeptide et des acides aminés issus de la dégradation du peptidoglycane	17
FIGURE I.11 : Voie de recyclage des sucres issus de la dégradation du peptidoglycane	18
FIGURE I.12 : Représentation schématique des complexes de synthèse du peptidoglycane actifs durant l'élongation et la division cellulaire	20
FIGURE I.13 : Représentation schématique du modèle de croissance trois pour un des bactéries Gram-négatives.....	21
FIGURE I.14 : Différents éléments du cytosquelette bactérien	23
FIGURE I.15 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez les coques et ovocoques.....	24
FIGURE I.16 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	25
FIGURE I.17 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez <i>C. glutamicum</i> et <i>S. coelicolor</i>	25
FIGURE I.18 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez <i>A. tumefaciens</i>	26
FIGURE I.19 : Les différents modèles de synthèse du peptidoglycane	30
FIGURE I.20 : Représentation schématique des composants du divisome d' <i>E. coli</i>	32
FIGURE I.21 : Représentation schématique du recrutement hiérarchique en deux phases (précoce et tardive) des composants principaux du divisome.....	33
FIGURE I.22 : Structure de FtsZ et de l'anneau-Z.....	34
FIGURE I.23 : Ancrage de FtsZ à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de FtsA et ZipA.....	35
FIGURE I.24 : Interaction des protéines Zaps avec les filaments de FtsZ.....	36
FIGURE I.25 : Mécanisme de constriction et modèle du roulement.....	37
FIGURE I.26 : Régulation spatiale de l'anneau-Z	38
FIGURE I.27 : Système Min	39
FIGURE I.28 : Schéma illustrant l'arrangement radial de FtsA / ZipA-FtsZ-ZapA-ZapB-MatP	40
FIGURE I.29 : Modèle illustrant les interactions entre les régions périplasmiques de FtsB, FtsI et FtsQ au sein du sous-complexe FtsBLQ.....	42
FIGURE I.30 : Topologie de FtsW	43
FIGURE I.31 : Modèle de la structure de PBP3.....	44
FIGURE I.32 : Structure de FtsN.....	45
FIGURE I.33 : Modèle de la collaboration de FtsN, FtsBLQ et FtsA pour l'activation de la synthèse du peptidoglycane au site de division.....	46

FIGURE I.34 : Complexe Tol-Pal et représentation du divisome lors de la constriction.	47
FIGURE I.35 : Alignement des sequences des membres de la famille amidase_3	48
FIGURE I.36 : Amidases de la division cellulaire de <i>E. coli</i>	49
FIGURE I.37 : Structure d'AmiC	50
FIGURE I.38 : Facteurs LytM de <i>E. coli</i>	50
FIGURE I.39 : Activation des amidases par EnvC et FtsEX.	52
FIGURE I.40 : Modèle de la régulation de NlpD pendant la division cellulaire	53
FIGURE III.1 : Représentation de la structure des variantes du lipide II utilisées	64
FIGURE III.2 : « O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder ».....	69
FIGURE III.3 : « Unstained Protein Molecular Weight Marker »	70
FIGURE III.4 : « PAGE Ruler prestained protein ladder »	70
FIGURE III.5 : Etapes de la construction de fusion à la sfGFP.....	76
FIGURE III.6 : Principe du dosage de l'activité glycosyltransférase avec le dansyle-lipide II	82
FIGURE IV.1 : Purification du complexe FtsW-PBP3.....	89
FIGURE IV.2 : Purification du complexe HisFtsW-PBP1b.....	90
FIGURE IV.3 : Purification du complexe HisPBP3-PBP1b.....	91
FIGURE IV.4 : Purification du complexe HisPBP3-FtsW-PBP1b	92
FIGURE IV.5 : Schéma des interactions de PBP1b et PBP3 avec FtsW.	92
FIGURE IV.6 : Purification du complexe HisPBP3-FtsW _{HA}	93
FIGURE IV.7 : Purification du complexe HisFtsW _{HA} -PBP1b.....	93
FIGURE IV.8 : Schéma des interactions de PBP1b et PBP3 avec la boucle 7/8 de FtsW	94
FIGURE IV.9 : Effets de FtsW, PBP3 et du complexe FtsW-PBP3 sur l'activité du PBP1b.....	96
FIGURE IV.10. Effets de FtsW sur l'activité du PBP1b stimulé par LpoB	97
FIGURE IV.11 : Effets de FtsW et du complexe FtsW-PBP3 sur l'activité transpeptidase du PBP1b	98
FIGURE IV.12 : Effets de FtsW, du PBP3 et du complexe FtsW-PBP3 sur la mobilité du lipide II et sur sa polymérisation par le PBP1b	99
FIGURE IV.13 : Mise en évidence de la co-migration du lipide II avec FtsW	102
FIGURE IV.14 : Courbe de croissance des cellules <i>E. coli</i> C43 (DE3) exprimant FtsW ou le complexe FtsW-PBP3	101
FIGURE IV.15 : Analyse de l'activité glycosyltransférase des protéines SEDS.....	102
FIGURE IV.16 : Analyse de l'effet de MurJ sur l'activité de polymérisation du lipide II par la PBP1b..	103
FIGURE IV.17 : Structure du domaine AMIN d'AmiC.....	104
FIGURE IV.18: Analyse de la purification du domaine AMIN ¹⁵ N	105
FIGURE IV.19 : Spectre BEST-TROSY ¹ H, ¹⁵ N-HSQC de ¹³ C, ¹⁵ N-AMIN	106
FIGURE IV.20 : Hydrolyse du peptidoglycane par AmiC et PBP4.....	107
FIGURE IV.21 : Analyse des variations de déplacement chimique (CSP) ou d'intensité (I/Iref) des résonances amide dans le spectre BEST-TROSY ¹ H, ¹⁵ N-HSQC du domaine AMIN après l'ajout de fragments de peptidoglycane.....	108
FIGURE IV.22 : Localisation de la zone d'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane traité par l'endopeptidase PBP4.....	109
FIGURE IV.23 : Analyse SDS-PAGE de la production de la protéine AmiC en milieu minimum et de sa purification	110
FIGURE IV.24 : Modèle bio-informatique de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane.	111
FIGURE IV.25 : Présentation des résidus d'intérêt pour la mutagenèse dirigée.....	112

FIGURE IV.26 : Analyse de la purification et du clivage de l'étiquette histidine et test de liaison au peptidoglycane du domaine AMIN V103A	114
FIGURE IV.27 : Analyse de l'expression du domaine AMIN fusionné à la sfGFP	115
FIGURE IV.28: Structure cristallographique d'AmiC et EnvC.....	118
FIGURE IV.29 : Analyse de la purification et du clivage de l'étiquette histidine du domaine LytM de NlpD.....	119
FIGURE IV.30 : Résultats de cristallisation du domaine LytM de NlpD	120
FIGURE V.1 : Modèle de régulation de l'activité de FtsW par PBP3	125
FIGURE V.2 : Modèle de liaison au peptidoglycane de MltE et Slt70.....	127

I. Introduction

1. La paroi bactérienne

Les bactéries, à l'exception des mycoplasmes, possèdent une paroi. Cette paroi bactérienne entourant la membrane cytoplasmique joue un rôle essentiel car elle permet à la bactérie de résister à sa pression osmotique interne ; elle lui confère sa forme ; elle représente une barrière physique contre des substances toxiques et peut contribuer à la pathogénicité. Il existe deux types de bactéries sur base de la structure de leur paroi : les bactéries à Gram positif ou à Gram négatif, dont la différence de structure de parois a été mise en évidence par une technique de coloration mise au point en 1884 par le bactériologiste danois Hans Christian Gram.

Chez les bactéries à Gram positif, la paroi est composée d'un épais **p**eptidoglycane (PG) de 20 à 80 nm d'épaisseur constitué de plusieurs couches de peptidoglycane reliées entre elles. Ce peptidoglycane est en contact direct avec le milieu extracellulaire et séparé de la membrane cytoplasmique par "l'espace périplasmique". On note à la surface du peptidoglycane la présence d'acides téichoïques (polymère à base de ribitol et de glycérol phosphate) attachés de manière covalente au peptidoglycane et d'acides lipoteichoïques qui sont ancrés dans la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire d'une partie lipidique (Fig. I.1). Ces polymères sont responsables de la spécificité antigénique et facilitent l'adhésion bactérienne aux cellules de l'hôte.

La paroi des bactéries à Gram négatif ne contient pas d'acides téichoïques ou lipoteichoïques mais comporte une membrane externe formée d'une bicouche lipidique asymétrique. Celle-ci présente à sa face externe des **l**ipop**o**lysaccharides (LPS), parfois impliqués dans la virulence et pouvant avoir un pouvoir antigénique, et à sa face interne des phospholipides. Cette membrane externe joue un rôle de barrière imperméable, elle contient des protéines (porines) et des transporteurs spécifiques lui permettant de laisser traverser petites et grosses molécules de manière contrôlée. Le peptidoglycane est beaucoup plus mince (2 à 7 nm) que chez les bactéries à Gram positif. Il n'est composé que d'une à deux couches et est attaché de manière covalente à la membrane externe par la lipoprotéine de Braun. Enfin l'espace périplasmique est plus important que chez les bactéries à Gram positif et contient énormément de protéines (Fig. I.1).

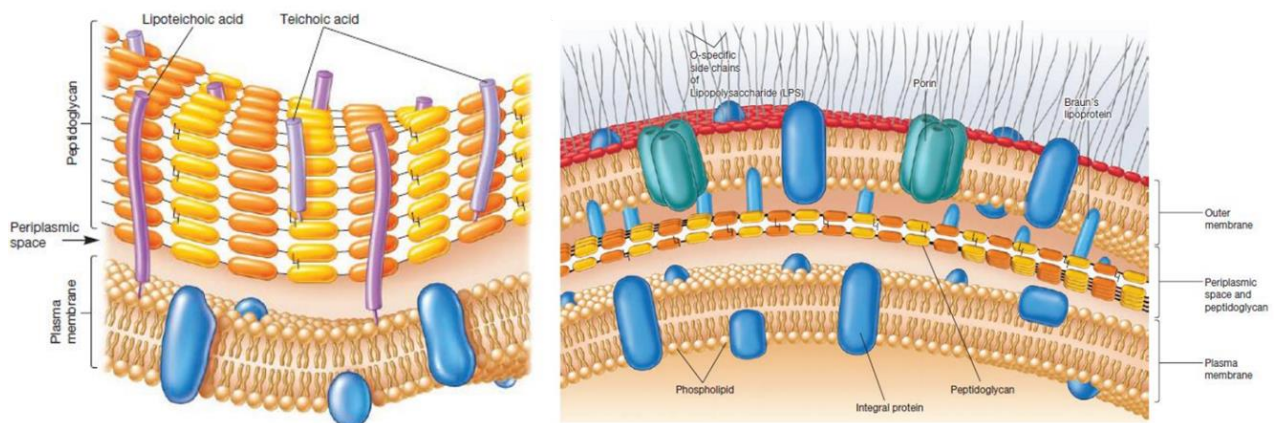


Figure I.1 : Les différents types de parois. A gauche paroi des bactéries à Gram positif. A droite paroi des bactéries à Gram négatif. (Prescott, 2007)

Il est à noter que chez certaines bactéries, la présence ou l'absence de peptidoglycane peut dépendre du cycle cellulaire ou de certaines conditions. En effet, chez différentes espèces de *chlamydia* la présence de peptidoglycane est observée uniquement durant la division cellulaire (Liechti *et al.*, 2016). Enfin, certaines bactéries sont capables de basculer sous forme-L, c'est à dire une variante dépourvue de peptidoglycane (Errington *et al.*, 2016; Errington, 2017).

1.1. Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est le composé essentiel et caractéristique de la paroi bactérienne. Il permet de maintenir la forme de la plupart des bactéries en formant un exosquelette (sacculus) formé de chaînes de glycanes pontées entre elles par de courts peptides (Fig. I.2A). Il en résulte une structure tridimensionnelle solide mais élastique qui lorsqu'elle est isolée, garde la taille et la forme de la bactérie dont elle est issue (Weidel and Pelzer, 1964; Vollmer *et al.*, 2008) (Fig. I.2B). Le peptidoglycane est aussi l'élément de la paroi bactérienne qui permet aux bactéries de résister à leur propre pression osmotique interne. En effet, l'inhibition de la synthèse ou la dégradation incontrôlée du peptidoglycane conduit à la lyse cellulaire faisant du peptidoglycane une cible de choix pour les composés antibiotiques. Durant la croissance cellulaire, le sacculus est agrandi par l'insertion de nouvelles chaînes de glycanes dans le peptidoglycane existant. Ce procédé implique des enzymes responsables de la synthèse et de l'hydrolyse du peptidoglycane ainsi que leurs régulateurs. L'ensemble de ces protéines forment des complexes multi-protéiques spécialisés permettant la croissance et la division de la bactérie.

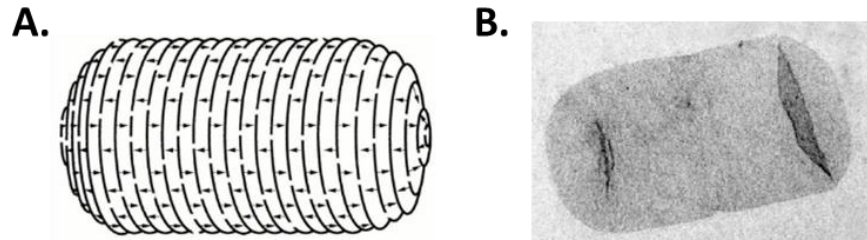


Figure I.2 : Le sacculus. A. Représentation d'un sacculus de bactérie de type bâtonnet. B. Sacculus purifié de *E. coli* (Holtje, 1998; Vollmer *et al.*, 2008).

1.1.1. Composition chimique du peptidoglycane

Le peptidoglycane est composé de chaînes de glycanes dont le motif de base est un disaccharide composé d'un résidu de N-acétyl glucosamine (GlcNAc) lié à un résidu d'acide N-acétyl muramique (MurNAc) par une liaison osidique β -1.4. Chaque disaccharide porte un court peptide lié au groupement lactyle du résidu MurNAc et qui a la particularité d'alterner des acides aminés en configuration L et D (Vollmer, 2008). La liaison des chaînes de glycanes entre elles par l'intermédiaire des peptides permet la formation d'une macromolécule tridimensionnelle qui renferme la cellule bactérienne. Malgré cette vision générale de la structure du peptidoglycane et la présence de composés conservés, il existe des variations de la composition du peptidoglycane entre les genres bactériens. La composition et la structure du peptidoglycane peuvent aussi varier en fonction de plusieurs facteurs comme la nature du milieu de croissance, la présence d'antibiotiques, la phase de croissance ou la mutation de certains gènes. L'épaisseur, le taux de pontage ou la séquence peptidique peuvent alors subir des modifications.

1.1.1.1. Variabilité des chaînes de glycanes

Les chaînes osidiques qui constituent le peptidoglycane sont relativement bien conservées dans les différents genres bactériens. Chez toutes les bactéries à Gram négatif et certaines à Gram positif, le MurNAc de fin de chaîne est modifié en 1,6-anhydroMurNAc (MurNAcAnh) par des transglycosylases lytiques (Höltje *et al.*, 1975) (Fig. I.3A).

D'autres modifications plus fréquentes peuvent s'opérer sur les sucres pendant ou juste après la synthèse des chaînes de glycanes. En effet, celles-ci sont sujettes à la *N*-désacétylation et/ou *O*-acétylation (Fig. I.3B et C). Ces modifications affectent l'activité des hydrolases du peptidoglycane, que ce soit les hydrolases propres à la bactérie (autolysines) ou d'origine externe comme par exemple le lysozyme humain. En effet, ces modifications confèrent une résistance au lysozyme, une enzyme importante du système immunitaire inné, capable de lyser les bactéries en clivant les chaînes de glycanes. En plus de conférer une résistance au lysozyme, les *N*-désacétylation et *O*-acétylation seraient impliquées dans la modulation des hydrolases endogènes de la bactérie. Les transglycosylases lytiques ont besoin d'une fonction C6-OH libre pour leur activité et sont incapables de cliver le peptidoglycane *O*-acétylé. L'abondance des sites *O*-acétylés du peptidoglycane pourrait donc jouer un rôle important dans la régulation de l'activité des transglycosylases lytiques (Clarke and Dupont, 1992). Une

étude chez *Lactobacillus plantarum* vient renforcer cette idée de régulation de la dégradation du peptidoglycane. Effectivement, dans celle-ci, il a été montré que l'*O*-acétylation du GlcNAc inhibe l'activité d'une des autolysines majeures de *L. plantarum* tandis que l'*O*-acétylation du MurNAc active l'autolyse via l'activité de l'amidase LytH (Bernard *et al.*, 2011)(Fig. I.3D). Enfin certaines modifications du peptidoglycane peuvent être plus spécialisées comme par exemple dans les spores de *Bacillus subtilis* où le MurNAc est sous forme lactame (Fig. I.3E).

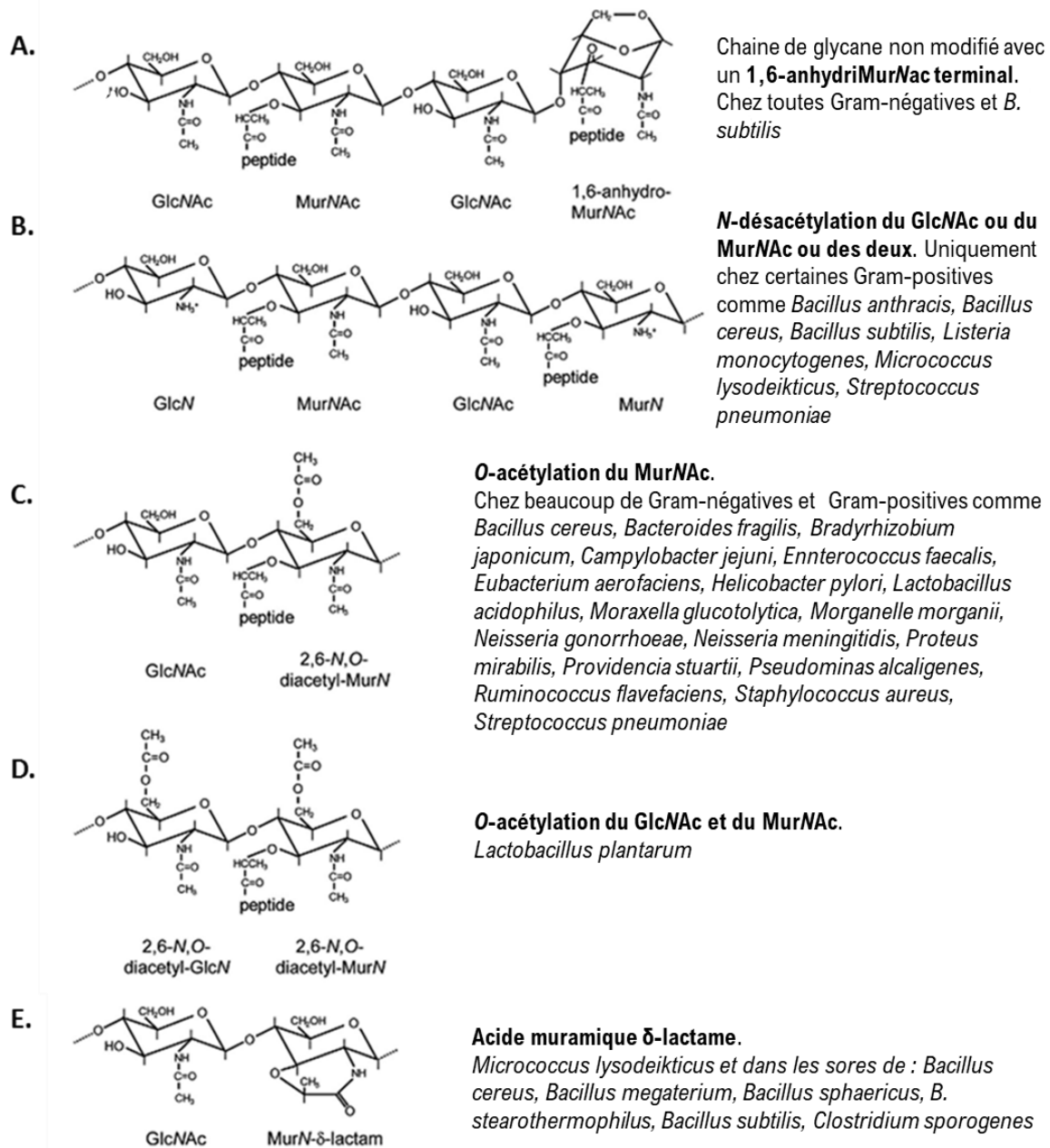


Figure I.3 : Modifications des chaînes de glycanes du peptidoglycane. A gauche sont représentées les modifications sur les sucres des chaînes de glycanes. A droite une liste d'exemples de bactéries qui présentent ces modifications. (Vollmer, 2015)

La longueur moyenne des chaînes de glycanes n'est pas homogène, elle varie et dépend de la bactérie et des conditions de culture (Vollmer and Seligman, 2010). Les bactéries avec de courtes chaînes de glycanes sont *Helicobacter pylori* et *Staphylococcus aureus* tandis que *B. subtilis* comporte de très longues chaînes. En effet, la longueur des chaînes isolées chez *B.*

subtilis est de ± 5000 unités disaccharidiques (Hayhurst *et al.*, 2008). Chez *E. coli*, la longueur des chaînes de glycanes varie de 1 à ± 80 unités disaccharidiques (Harz *et al.*, 1990). Il faut noter que les techniques utilisées sont différentes et que les longueurs sont ici données à titre informatif. Les chaînes de glycanes nouvellement synthétisées chez *E. coli* sont composées de 60 à 80 unités disaccharidiques et sont traitées juste après pour atteindre leurs longueurs finales moyennes de 20 à 40 unités disaccharidiques bien que les plus abondantes soient composées de 8 à 14 unités (Derouaux *et al.*, 2013).

1.1.1.2. Variabilité de la partie peptidique

La chaîne peptidique du peptidoglycane est synthétisée sous forme d'un pentapeptide qui selon les espèces peut être modifiée ou recevoir des acides aminés ou peptides supplémentaires (Barreteau *et al.*, 2008). La chaîne peptidique est liée au résidu MurNAc par son acide aminé N-terminal qui est à quelques exceptions près toujours une L-Alanine. Chez toutes les espèces l'acide D-Glutamique est ajouté en position 2 du pentapeptide. Chez les bactéries à Gram négatif le résidu iso-D-Glu reste inchangé tandis que chez la plupart des bactéries à Gram positif, il est modifié en D-iGln (D-iso-Glutamine) (Schleifer and Kandler, 1972). L'acide aminé en position 3 est celui qui varie le plus selon l'espèce bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatif et quelques bactéries à Gram positif (*B. subtilis*), on retrouve l'acide **méso-diaminopimélique** (méso-A₂pm) alors que chez beaucoup de bactéries à Gram positif comme *S. aureus* et *Streptococcus pneumoniae* c'est une L-Lysine que l'on retrouve en position 3. Mais cette position peut aussi être occupée par la L-ornithine (chez les spirochetes), le LL-A₂pm (chez beaucoup d'actinomycètes), la méso-lanthionine (*Fusobacterium nucleatum*), le L-2,4-diaminobutyrate (*Corynebacterium aquaticum*) ou la L-homosérine (*Corynebacterium poinsettia*) (Schleifer and Kandler, 1972; Vollmer *et al.*, 2008). En position 4 et 5, on retrouve le dipeptide D-alanine-D-alanine. Cependant, en fonction de l'espèce et des conditions de culture, une glycine peut substituer la D-Ala en position 4 ou 5. Chez beaucoup de bactéries, un à sept acides aminés peuvent être ajoutés en position 2 ou 3 de la chaîne peptidique (Schleifer and Kandler, 1972). Les acides aminés ajoutés peuvent être des Gly, L-Ala, L- ou D-Ser, D-Asn, D-Asp, ou encore D- ou L-Glu et sont souvent impliqués dans le pontage avec une chaîne peptidique voisine, formant alors un pont interpeptidique (Fig. I.4 B). Un exemple typique est le cas de *S. aureus* qui possède un pont peptidique pentaglycine (Gly₅) attaché à la lysine en position 3 du pentapeptide (Fig. I.4D).

Il existe différents types de pontages interpeptidiques. Le plus commun est le pontage 4-3 qui connecte l'acide aminé en position 3 (le plus souvent une L-Lys ou le méso-A₂pm) d'une chaîne à la D-Ala en position 4 de la chaîne adjacente (Fig. I.4C). Les pontages de type 4-2 sont retrouvés parmi les corynebactéries. Ce pontage 4-2 a lieu entre la fonction α -carboxylique du D-Glu en position 2 et la fonction carboxylique du D-Ala en position 4 par le biais d'un pont interpeptidique comprenant un acide diaminé (Schleifer and Kandler, 1972; Vollmer, 2008) (Fig. I.4F). Dans les deux cas, ce pontage est réalisé par les DD-transpeptidases, aussi appelées « **P**enicillin **B**inding **P**roteins » (PBPs) (Sauvage *et al.*, 2008). Chez beaucoup de bactéries, on retrouve en plus du pontage 4-3 une fraction de pontage 3-3. Ce dernier se produit entre le

groupement amine de l'acide diaminé en position 3 et le groupement α -amino d'un acide diaminé en position 3 d'une autre chaîne peptidique. Chez *E. coli* le pourcentage de pontage 3-3 est très faible mais augmente lors de la phase stationnaire jusqu'à $\pm 10\%$ (Glauner and Holtje, 1990). Ce type de pontage est effectué par des LD-transpeptidases qui sont des enzymes possédant une cystéine catalytique. La plupart des β -lactamines (excepté les carbapénèmes) n'inhibent pas la formation des ponts peptidiques de type LD catalysé par les LD-transpeptidases, enzymes qui sont d'ailleurs différentes des PBPs. En fait, les LD-transpeptidases peuvent remplacer les PBPs dans les souches d'*Enterococcus faecium* résistantes aux β -lactamines (Mainardi *et al.*, 2008) (Fig. I.4E). Un mécanisme similaire de résistance aux β -lactamines a pu être simulé chez *E. coli* par pression de sélection (Hugonnet *et al.*, 2016). En outre, chez *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium abscessus*, il a été montré que les ponts interpeptidiques de type 3-3 formés par les LD-transpeptidases sont majoritaires (Lavollay *et al.*, 2008; Lavollay *et al.*, 2011).

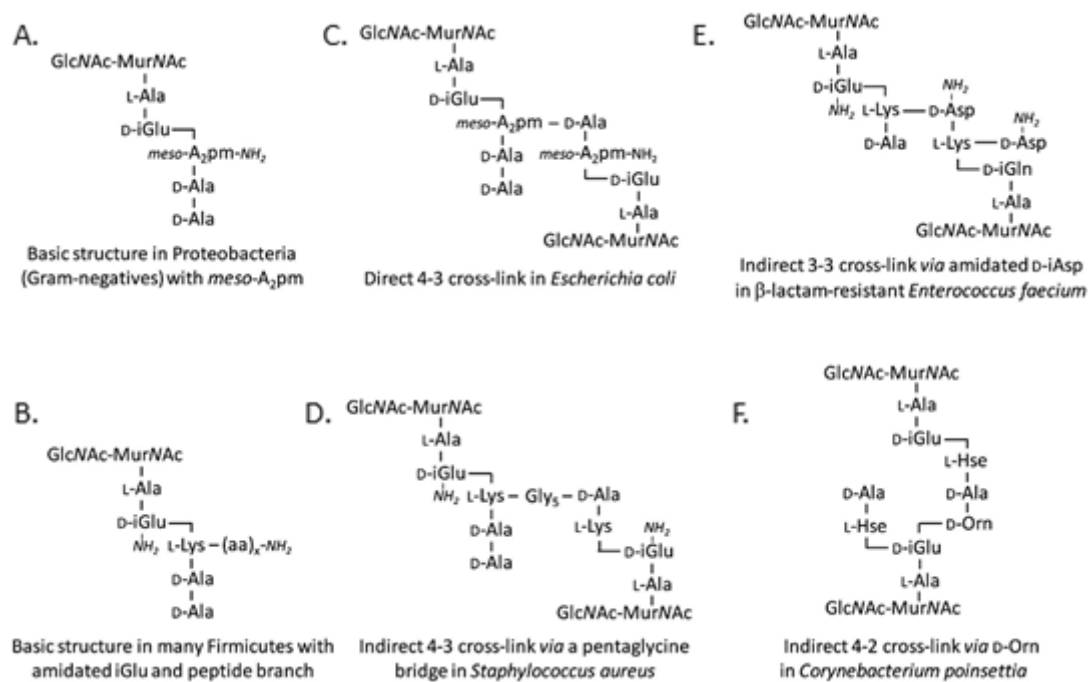


Figure I.4 : Variabilité des liaisons peptidiques du peptidoglycane. **A.** Les protéobactéries à Gram-négatif ont un acide méso-diaminopimélique en position 3 du peptide. **B.** Les bactéries à Gram-positif de type firmicute présentent typiquement un résidu D-iGln en position 2, une L-lysine en position 3 et en fonction du genre, une branche peptidique composé de 1 à 7 acides aminés. **C.** Pontage direct entre le résidu en position 3 et celui en position 4 (*E. coli*). **D.** Pontage indirect via un pont interpeptidique entre les résidus en positions 3 et 4 (*S. aureus*). **E.** Pontage de type 3-3 comme chez *E. faecium*. **F.** Pontage de type 4-2 observé uniquement chez les corynebactéries. (Vollmer, 2015)

En plus des variations de composition et de types de pontage, le degré de transpeptidation du peptidoglycane varie lui aussi selon le genre bactérien, le stade de croissance ou encore les compositions de milieux.

1.1.2. Biosynthèse du peptidoglycane

Bien que le peptidoglycane présente des différences de structures entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif ainsi qu'au sein des genres, globalement son processus de synthèse reste le même. Cette biosynthèse se déroule en une série de réactions complexes réparties en fonction de leur localisation : une phase cytoplasmique de synthèse des précurseurs solubles, une phase membranaire de synthèse et de transfert des précurseurs lipidiques du cytoplasme vers le périplasma et une phase périplasmique de polymérisation.

1.1.2.1. Phase cytoplasmique : synthèse des précurseurs solubles

Les premières étapes de la synthèse du peptidoglycane se déroulent dans le cytoplasme pour aboutir à la synthèse des précurseurs solubles : l'UDP-GlcNAc et l'UDP-MurNAc-pentapeptide (Fig. I.5).

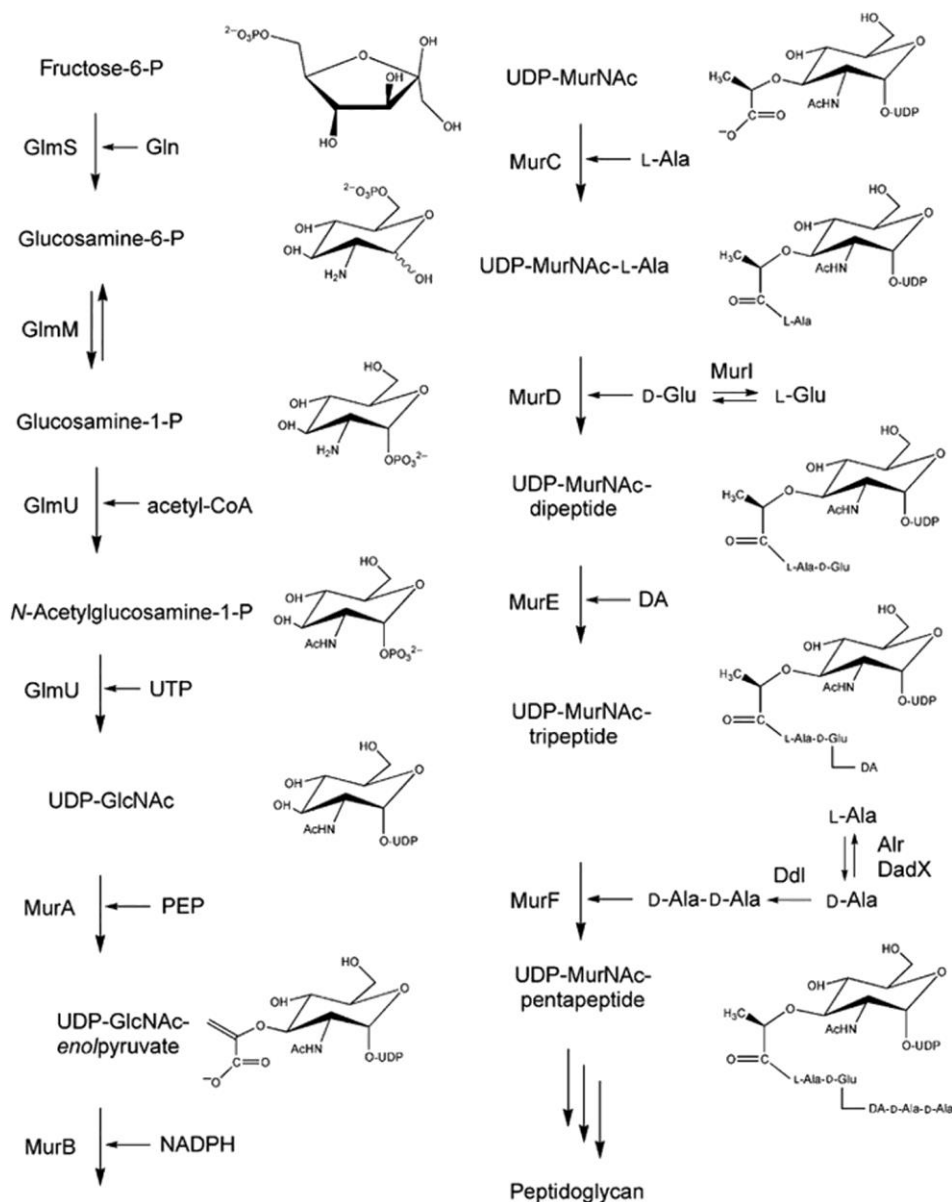


Figure I.5 : Etapes cytoplasmiques de la biosynthèse du peptidoglycane. (Barreteau *et al.*, 2008)

1.1.2.2. Phase membranaire : biosynthèse du lipide I et II

La première étape de la phase membranaire est le transfert du résidu phospho-MurNAc-pentapeptide de l'UDP-MurNAc-pentapeptide sur le transporteur lipidique, undécaprényl phosphate (C55-P). Cette réaction est catalysée par la transférase MraY pour conduire au premier précurseur membranaire l'undécaprényl-pyrophosphoryl-MurNAc-pentapeptide ou lipide I. Ensuite l'enzyme MurG catalyse le transfert de la N-acétylglucosamine de l'UDP-GlcNAc sur le carbone en position 4 de l'acide muramique du lipide I pour donner l'undécaprényl-pyrophosphoryl-N-acétylmuramyl(pentapeptide)-N-acétylglucosamine ou lipide II. Chez *E. coli*, les quantités disponibles de lipide I et lipide II ont été estimées respectivement à environ 700 et 2000 molécules par cellule (Van Heijenoort *et al.*, 1992). Le lipide II initialement ancré sur la face interne de la membrane cytoplasmique par le biais de l'undécaprényl doit ensuite être transféré du côté externe de la membrane cytoplasmique. Ce passage à travers la membrane ne nécessite pas d'énergie mais n'est pas un procédé spontané. Il se fait par l'intermédiaire d'une flippase. Il existerait alors un couplage entre la translocation du lipide II et sa polymérisation en chaînes de glycanes par les PBPs (Van Dam *et al.*, 2007). La translocation serait effectuée par les protéines de la famille SEDS (**S**hape, **E**longation, **D**ivision and **S**porulation) RodA et FtsW (Mohammadi *et al.*, 2011). Cependant, une autre flippase a récemment été identifiée, la protéine MurJ (voir ci-après) (Meeske *et al.*, 2015; Kuk *et al.*, 2017; Bolla *et al.*, 2018).

1.1.2.3. Phase périplasmique : polymérisation

Durant la phase finale de biosynthèse du peptidoglycane, le lipide II se trouvant à présent sur la surface externe de la membrane cytoplasmique va servir de substrat aux PBPs. Leur nom vient de la capacité de ces protéines à lier de manière covalente la pénicilline et d'autres β -lactamines qui miment le dipeptide D-Ala-D-Ala du lipide II (Tipper and Strominger, 1965). Les PBPs catalysent la polymérisation des chaînes de glycanes à partir du lipide II par leur activité transglycosylase (ou **glycosyl****transférase**) (GTase) et la formation de liens peptidiques entre les chaînes de glycanes par leur activité **trans****peptidase** (TPase).

1.1.2.3.1. La réaction de transglycolysation

Durant la réaction de transglycolysation le résidu glutamate du site actif (par exemple le E233 du PBP1b d'*E. coli*) catalyse la déprotonation du GlcNAc 4-OH du lipide II lequel va effectuer une attaque nucléophile sur le carbone en position 1 du MurNAc de la chaîne polysaccharidique en croissance, créant ainsi une nouvelle liaison osidique β -1,4 (Terrak *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2002) (Fig.1.6). L'undécaprényl pyrophosphate ainsi libéré est déphosphorylé et transloqué du côté interne de la membrane cytoplasmique pour être utilisé dans un nouveau cycle de polymérisation (Bouhss *et al.*, 2008). La réaction de transglycolysation est processive cependant, le contrôle de la taille des chaînes et le mécanisme de libération de cette dernière par la protéine restent inconnus. Chez *E. coli*, la

transglycosylase lytique MltG jouerait le rôle de « terminase » en interagissant avec le PBP1b et en clivant spécifiquement les chaînes de glycanes en croissance (Yunck *et al.*, 2016).

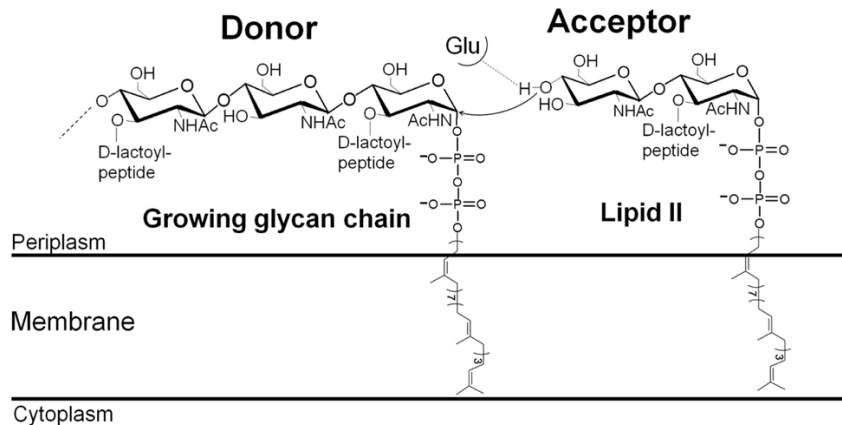


Figure I.6. Mécanisme de la réaction de transglycolysation. (Derouaux *et al.*, 2013)

1.1.2.3.2. Réaction de transpeptidation

La réaction de transpeptidation assure la réticulation du peptidoglycane par la formation de liaisons entre les chaînes peptidiques portées par des chaînes de glycanes adjacentes. Cette réaction nécessite un pentapeptide donneur qui va perdre sa D-Ala terminale durant la réaction et un accepteur qui peut être un tri-, tétra- ou pentapeptide.

La réaction de DD-transpeptidation est réalisée en deux étapes. Dans la première étape, la liaison D-Ala-D-Ala du donneur est clivée avec la formation d'un intermédiaire covalent (l'acyl-enzyme) entre le groupement carboxyle de la D-Ala en position 4 et le groupement hydroxyle de la sérine active de l'enzyme. L'énergie nécessaire à la réticulation du peptidoglycane provient de la liaison peptidique D-Ala-D-Ala du donneur. Dans la seconde étape, le groupement amine nucléophile porté par l'acide diaminé en position 3 de l'accepteur, attaque l'acyl-enzyme pour former la liaison peptidique (Sauvage *et al.*, 2008) (Fig. I.7).

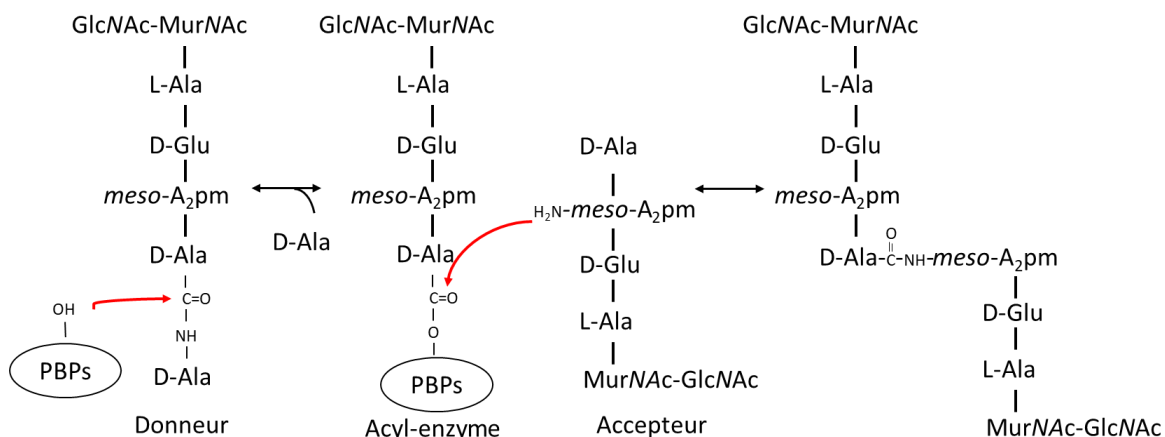


Figure I.7. Mécanisme de la réaction de DD-transpeptidation.

1.1.3. Les « Penicillin-Binding Proteins » ou PBPs

Les PBPs sont des enzymes qui appartiennent à la famille des acyl-sérine transférases ; elles assurent la polymérisation et l'insertion du peptidoglycane dans la paroi existante. Comme mentionné précédemment, ces enzymes catalysent les réactions de transglycosylation et de transpeptidation. On distingue les PBPs de hauts poids moléculaires et les PBPs de faibles poids moléculaires (Sauvage *et al.*, 2008). Les PBPs de hauts poids moléculaires sont des enzymes multimodulaires qui peuvent être mono- ou bi-fonctionnelles. Leur structure consiste en une courte séquence cytoplasmique, un segment transmembranaire et deux domaines reliés par une jonction. C'est dans cette jonction que l'on trouve chez certaines PBPs un petit domaine supplémentaire qui joue le rôle de site d'interaction pour des protéines régulatrices (Typas *et al.*, 2012). En se basant sur leurs structures et l'activité de leur domaine N-terminal, elles peuvent être réparties en deux groupes : les PBPs bi-fonctionnelle GTase/TPase de classe A et les PBPs monofonctionnelles TPase de classe B. Le domaine C-terminal ou « Penicillin-Binding Domain » des deux classes possède l'activité DD-transpeptidase. Chez les classes A, le domaine N-terminal est responsable de leur activité glycosyltransférase tandis que chez les classes B, le domaine N-terminal ne possède pas d'activité enzymatique connue et jouerait un rôle dans le positionnement du domaine transpeptidase à distance optimale de la membrane, l'interaction avec d'autres protéines ainsi que dans le repliement et la stabilité de la protéine (Goffin *et al.*, 1996; Nguyen-Distèche *et al.*, 1998; Marrec-Fairley *et al.*, 2000). Plusieurs structures cristallographiques de PBPs de classe A sont disponibles, notamment celle des PBP2 de *S. aureus* et PBP1b d'*E. coli* (Lovering *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2009). Ces structures, en présence ou en absence d'inhibiteurs, montrent que les domaines glycosyltransférase et transpeptidase sont conservés et que le domaine transpeptidase des PBPs de classe A est similaire à celui des classes B.

D'autres enzymes possédant une activité glycosyltransférase ou DD-peptidase spécifique au métabolisme du peptidoglycane ont été identifiées. En effet, certaines bactéries (dont *E. coli* et *S. aureus*) présentent des transglycosylase monofonctionnelles, les MTG (Di Bernardino *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001). Ces enzymes présentent une homologie de séquence avec le domaine N-terminal des PBPs de classe A (Sauvage *et al.*, 2008).

Les PBPs de faibles poids moléculaires (appelés aussi PBPs de classe C) sont impliqués dans la maturation, le recyclage du peptidoglycane ainsi que dans la morphogénèse bactérienne (Nelson and Young, 2001). Ce sont majoritairement des DD-carboxypeptidases et/ou DD-endorpeptidases. Ces PBPs semblent accessoire car leur inhibition n'affecte pas la viabilité des cellules dans les conditions de laboratoire. En revanche, certaines inactivations multiples sont accompagnées d'aberrations morphologiques (Denome *et al.*, 1999).

E. coli possède douze PBPs, trois PBPs de classe A (PBP1a, PBP1b et PBP1c), deux PBPs de classe B (PBP2 et PBP3) et sept PBPs de classe C (PBP4, PBP4b, PBP5, PBP6, PBP6b, PBP7/8 et AmpH).

Les PBPs de classe A, PBP1a et PBP1b, sont redondantes, quoiqu'elles présentent des spécificités fonctionnelles ; au moins une de ces deux protéines est nécessaire pour la

croissance cellulaire mais une double délétion des gènes correspondants est létale (Spratt *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1978). PBP1c quant à elle n'est pas essentielle et n'est pas affectée par la plupart des β -lactamines. La surexpression de PBP1c ne permet pas la viabilité du double mutant PBP1a, PBP1b (Schiffer and Höltje, 1999). Le PBP2 joue un rôle spécifique dans la phase d'élongation alors que PBP3 est une protéine spécifique de la division (Spratt, 1975). La transpeptidase monofonctionnelle PBP2 interagit et collabore avec PBP1a pour la synthèse du peptidoglycane lors de la phase d'élongation (Banzhaf *et al.*, 2012). De la même manière, PBP1b interagit avec la transpeptidase de classe B PBP3 et les deux protéines collaborent pour la synthèse du peptidoglycane septal lors de la division (Bertsche *et al.*, 2006; Banzhaf *et al.*, 2012). Ces résultats viennent supporter l'hypothèse de Höltje dans laquelle les PBPs de hauts poids moléculaires sont actives dans des complexes multiprotéiques impliqués dans la division et dans l'élongation (Höltje, 1998).

Les PBP4 et PBP7/8 sont deux DD-endopeptidases qui viennent cliver les ponts peptidiques reliant les chaînes de glycanes (Vollmer *et al.*, 2008). PBP5 est la DD-carboxypeptidase principale, la plus abondante. Elle hydrolyse les liaisons D-Ala₄-D-Ala₅ permettant un contrôle indirect du degré de réticulation du peptidoglycane et joue un rôle primordial dans le maintien de la forme de la bactérie (Spratt and Strominger, 1976; Denome *et al.*, 1999). PBP6 et PBP6b présentent des séquences homologues à PBP5 et ont la même activité que cette dernière. Enfin PBP4b est une DD-carboxypeptidase et AmpH présente les activités DD-endopeptidase et DD-carboxypeptidase. Elle a aussi une faible activité β -lactamase (González-Leiza *et al.*, 2011).

Chaque bactérie possède son propre assortiment de PBPs. Certaines PBPs jouent un rôle essentiel dans des processus comme l'élongation, la division ou encore la sporulation alors que d'autres ont une activité redondante ou ne sont pas essentielles à la bactérie (Sauvage *et al.*, 2008; Typas *et al.*, 2012). Le nombre et la nature des PBPs d'une bactérie sont directement liés à la complexité de son cycle cellulaire mais aussi à d'éventuelles capacités de résistance aux β -lactamines ou encore à la production de métabolites secondaires. En effet, chez les bactéries qui ne possèdent pas de phase d'élongation comme les bactéries de type coque, on aura tendance à retrouver moins de PBPs. C'est le cas par exemple de *Neisseria gonorrhoeae* une bactérie à Gram négatif et de *S. aureus*, une bactérie à Gram positif qui ne possèdent chacune que quatre PBPs. Les souches de *S. aureus* sensibles aux β -lactamines possèdent deux PBPs de classe B mais les souches résistantes ont acquis une PBP de classe B supplémentaire, PBP2a avec une faible sensibilité aux β -lactamines. De la même manière, chez *B. subtilis*, qui est l'organisme modèle pour la sporulation des bactéries à Gram positif, on retrouve un nombre plus élevé de PBPs (plus de 16), ce qui reflète la fonction des PBPs dans les différentes étapes du cycle cellulaire. Enfin notons le cas particulier des Streptomyces qui présentent un nombre important de PBPs qu'ils expriment en fonction de leur stade de développement ou quand ils produisent des métabolites secondaires pouvant interférer avec la biosynthèse du peptidoglycane (Vollmer, 2015).

1.1.4. Remodelage et recyclage du PG

Le peptidoglycane subit continuellement des modifications pour permettre la croissance et la division de la bactérie (Holtje, 1998). Le peptidoglycane se trouve donc dans un état d'équilibre dynamique et subit à tout moment de nombreux remaniements qui se traduisent par le réarrangement de liaisons et le recyclage partiel de ses constituants (Goodell, 1985; Holtje and Tuomanen, 1991).

1.1.4.1. Les hydrolases du PG

Les hydrolases du peptidoglycane forment un vaste groupe de protéines extrêmement diversifiées et présentant une grande gamme de fonctions (Vollmer *et al.*, 2008). En fait, il existe une hydrolase spécifique pour presque chaque liaison covalente retrouvée dans le peptidoglycane (Fig. I.8 et I.9). Elles sont impliquées dans la croissance, la maturation et le recyclage du peptidoglycane ainsi que dans la production de molécules signal pour l'induction de β -lactamases ou le réveil à partir du stade de dormance. Elles jouent aussi un rôle dans le remaniement du peptidoglycane pour l'assemblage de structures telles que les systèmes de sécrétion, les flagelles ou les fimbriae. Ces hydrolases sont utilisées par tous les organismes incluant les bactéries, les bactériophages, les champignons, les plantes et les animaux comme armes anti-bactériennes. Par exemple, le lysozyme est produit par bon nombre d'organismes, y compris l'homme pour combattre les bactéries envahissantes en digérant leur peptidoglycane. En fait, les bactéries elles-mêmes utilisent des hydrolases du peptidoglycane contre d'autres bactéries (Vollmer, 2015). Les hydrolases du peptidoglycane peuvent être classées selon leur site de clivage (Vollmer *et al.*, 2008). Les principales classes sont les *N*-acétyl-muramyl-L-Ala amidases (amidases), les endopeptidases (DD-, DL- ou LD-EPases), les carboxypeptidases (DD- ou LD-CPases), les *N*-acétylglucosaminidases et les muramidases. Ces deux dernières classes clivent dans les chaînes de glycanes. Chaque bactérie possède de multiples hydrolases du peptidoglycane. Par exemple, *E. coli* comprend plus de 17 hydrolases périplasmiques incluant quatre amidases (AmiA, AmiB, AmiC et AmiD), au moins huit transglycosylases lytiques (Slt70, MltA, MltB, MltC, MltD, MltE, MltF et MltG), six endopeptidases (PBP4, PBP7, MepA, Spr, YebA, YdhO) et quatre carboxypeptidases (PBP5, PBP6, PBP6B, PBP4) (van Heijenoort, 2007; Typas *et al.*, 2012; Yunck *et al.*, 2016; Alcorlo *et al.*, 2017). Alors que *B. subtilis* compte jusqu'à 35 hydrolases connues ou prédites (Smith *et al.*, 2000). Cette redondance fait qu'il est souvent difficile d'assigner un rôle spécifique à une hydrolase donnée. De plus, on ignore souvent comment le danger potentiel que représentent les hydrolases est régulé au sein de la cellule.

1.1.4.1.1. Les N-acétylglucosaminidases

Les endo-*N*-acétyl- β -D-glucosaminidases (*N*-acétylglucosaminidases) sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons glycosidiques entre les résidus *N*-acétyl- β -D-glucosamine et les monosaccharides adjacents dans des substrats oligosaccharidiques comme le peptidoglycane

ou la chitine (Karamanos, 1997). Au niveau du peptidoglycane, ces enzymes clivent donc le lien entre le résidu GlcNAc et le résidu MurNAc adjacent (Fig. I.8).

1.1.4.1.2. Les muramidases

Il existe deux types majeurs de muramidases : les lysozymes et les transglycosylases lytiques. Le mécanisme et le produit de réaction ne sont pas les mêmes ; les lysozymes hydrolysent le lien glycosidique entre le MurNAc et le GlcNAc et forme un résidu MurNAc réduit tandis que les transglycosylases lytiques catalysent une réaction de transglycolysation intramolécule qui conduit à l'hydrolyse du lien β -1,4 glycosidique entre le MurNAc et le GlcNAc et à la formation d'une liaison 1,6-anhydro entre le C1 et le C6 du résidu MurNAc (Thunnissen *et al.*, 1994; Jolles, 1996) (Fig. I.8). *E. coli* possède au moins huit transglycosylases lytiques dont sept d'entre elles sont des lipoprotéines liées à la membrane externe et une soluble dans le périplasme, Slt70. Des différences au niveau des spécificités de substrats sont observées entre ces protéines. Par exemple, Slt70 clive uniquement les chaînes de glycanes portant des peptides tandis que MltA clive aussi bien des chaînes nues que des chaînes portant des peptides (Romeis *et al.*, 1993; Ursinus and Holtje, 1994).

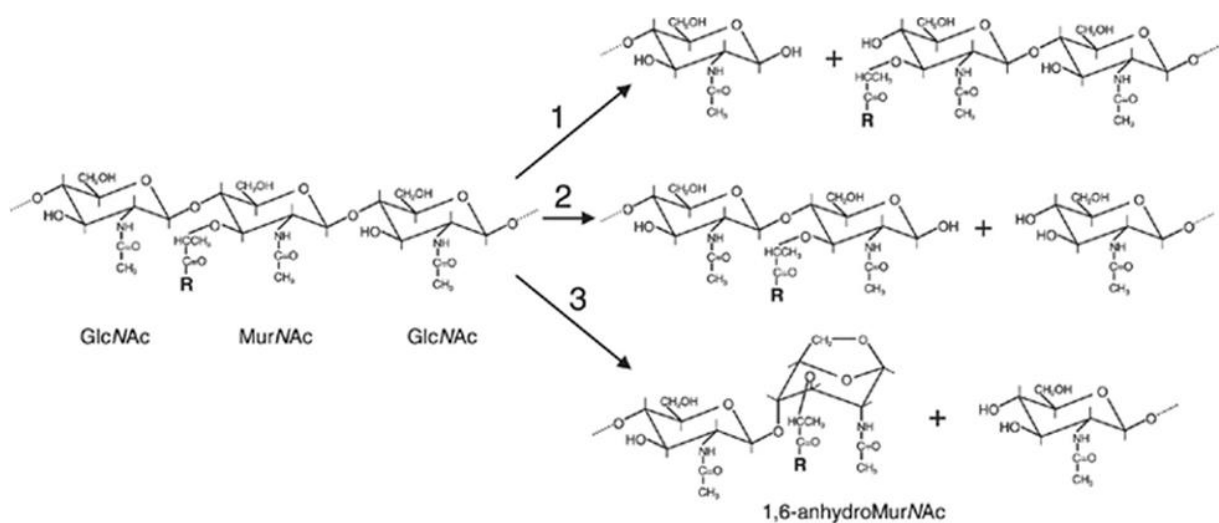


Figure I.8 : Clivage du lien glycosidique dans le peptidoglycane. 1. *N*-acétylglucosaminidases 2. Lysozyme 3. Transglycosylases lytiques. **R** : le peptide attaché au résidu MurNAc. (Vollmer *et al.*, 2008)

1.1.4.1.3. Les endopeptidases et carboxypeptidases

Ces enzymes clivent les ponts entre les acides aminés dans le peptidoglycane ou des fragments solubles de celui-ci. Il existe une large gamme de peptidases connues pour cliver les différents liens amides dans les diverses variétés de peptidoglycane. En fonction de leur spécificité, les peptidases du peptidoglycane sont classées comme carboxypeptidases (elles retirent l'acide aminé terminal) ou endopeptidases (elles clivent dans le peptide). Enfin, les DD-peptidases clivent entre deux acides aminés de configuration D, tandis que les LD- ou DL- peptidases

clivent entre un acide aminé de configuration L et un de configuration D ou l'inverse (Shockman and Höltje, 1994; Smith *et al.*, 2000) (Fig. I.9).

En plus des DD-endopeptidases PBP4, PBP7 qui hydrolysent le pontage *meso*-A₂pm-D-Ala qui a été formé par l'activité DD-transpeptidase des PBPs de classe A et B, il existe des DD-endopeptidases non reliées aux PBPs et qui ne sont pas inhibées par les β -lactamines, comme MepA qui hydrolyse aussi bien les liaisons peptidiques DD-(*meso*-A₂pm-D-Ala) que les liaisons LD-(*meso*-A₂pm-*meso*-A₂pm) (Fig. I.9) (Goffin and Ghuysen, 1998; Sauvage *et al.*, 2008). Elle partage des similarités structurales avec un large groupe de métallopeptidases incluant par exemple, l'endopeptidase LytM ou la lysostaphine qui clivent toutes deux les ponts interpeptidiques pentaglycine dans le peptidoglycane des *S. aureus* (Vollmer *et al.*, 2008). Enfin, les DD-endopeptidases Spr, YebA et YdhO ont une fonction essentielle pour la viabilité et la croissance cellulaire (Singh *et al.*, 2012).

1.1.4.1.4. Les N-Acétilmuramyl-L-Alanine amidases

Les N-Acétilmuramyl-L-Alanine amidases (amidases) clivent le lien amide entre le MurNAc et le résidu L-alanine en N-terminal du peptide (Fig. I.9). Le plus souvent, plusieurs amidases différentes sont présentes dans le protéome bactérien. Chez *E. coli*, on compte cinq amidases, AmiA, AmiB, AmiC et AmiD que l'on retrouve dans le périplasme et AmpD localisée dans le cytoplasme (Jacobs *et al.*, 1995; Heidrich *et al.*, 2001; Uehara and Park, 2007). Après le clivage de leur peptide signal, AmiA, AmiB et AmiC sont solubles dans le périplasme tandis qu'AmiD reste attaché à la membrane externe. AmiA, AmiB et AmiC jouent un rôle majeur et redondant lors de la séparation des cellules filles. Les double et triple mutants montrent un phénotype en chaînette ce qui reflète l'incapacité de la cellule à cliver le peptidoglycane au septum durant la division (Heidrich *et al.*, 2001). Ces amidases requièrent une activation par deux protéines de type LytM, EnvC et NlpD (Uehara *et al.*, 2010). EnvC active spécifiquement AmiA et AmiB alors que NlpD active AmiC. Le mécanisme d'activation est connu pour AmiB et AmiC, lesquels sont inactives suite à l'encombrement de leur site actif par une hélice α (Rocaboy *et al.*, 2013). L'interaction avec EnvC active AmiB, en induisant un changement de conformation de la protéine qui déplace l'hélice α du site actif et permet la fixation du substrat. EnvC lui-même a besoin d'être activé en interagissant avec les protéines de la division FtsEX (Yang *et al.*, 2011). Dans le cas, d'AmiC, l'hélice α est déplacée du site catalytique par son interaction avec NlpD, probablement via le domaine LytM (Rocaboy *et al.*, 2013). L'amidase cytoplasmique AmpD fait partie des enzymes qui dégradent le 1,6-anhydroMurNAc-tetra ou -tripeptide provenant du recyclage du peptidoglycane. Par contre, la lipoprotéine AmiD clive dans les muropeptides, avec ou sans groupement 1,6-anhydro sur le MurNAc (Uehara and Park, 2007).

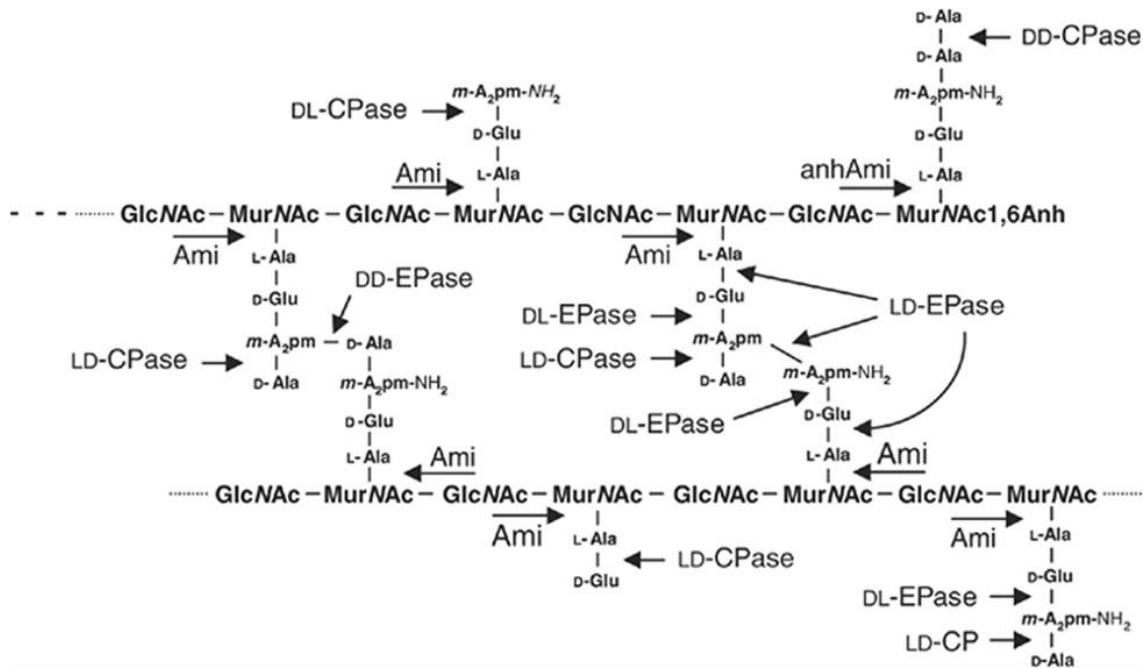


Figure I.9 : Hydrolyse des liaisons amides ou peptidiques du peptidoglycane. La structure et la composition du peptidoglycane sont celles retrouvées chez *E. coli* et *B. subtilis*. Les *N*-Acétylmuramyl-L-Alanine amidases (Ami) hydrolysent le lien amide entre le groupement lactyl du MurNAc et la L-alanine du peptide. Certaines amidases (anhAmi) clivent spécifiquement les résidus 1,6-anhydro-MurNAc. Les endopeptidases (DD-EPase, LD-EPase, DL-EPase) clivent les liens amides dans le peptide. Les carboxypeptidases (DD-CPase, LD-CPase, DL-CPase) hydrolysent le lien peptidique pour retirer l'acide aminé D- ou L- en position -C-terminale du peptide (Vollmer *et al.*, 2008).

1.1.4.2. Recyclage du PG

Le remaniement du peptidoglycane par ces différentes hydrolases représente en une génération 40-50% du peptidoglycane synthétisé par une cellule d'*E. coli* ce qui reflète un haut taux de recyclage lorsque l'on considère la mince couche de peptidoglycane et le besoin constant de maintenir l'intégrité de celle-ci (Park and Uehara, 2008). Les principaux produits résultant de ce remaniement sont les résidus GlcNAc-1,6-anhydro-MurNAc-tetrapeptide et -tripeptide libérés dans le périplasma. Ces derniers sont transportés dans le cytoplasme par la perméase spécifique AmpG. Plusieurs enzymes cytoplasmiques sont impliquées dans le recyclage de ces fragments de peptidoglycane.

L'amidase AmpD libère les tetra- ou tripeptides lesquels peuvent alors être attachés à l'UDP-MurNAc par la ligase Mpl. Ces peptides rentrent ainsi à nouveau dans le cycle de synthèse du peptidoglycane. La spécificité d'AmpD pour les muuropeptides contenant le résidu 1,6-anhydroMurNAc évite qu'elle ne dégrade les précurseurs du peptidoglycane. La LD-carboxypeptidase LdcA permet d'assurer la seule formation de l'UDP-MurNAc-tripeptide en agissant sur le tetrapeptide ou sur l'UDP-MurNAc-tetrapeptide. En absence de LdcA, il y a accumulation d'UDP-MurNAc-tetrapeptide au lieu d'UDP-MurNAc-pentapeptide et donc une incorporation dans le peptidoglycane de tetrapeptide au lieu de pentapeptide. Il en résulte des aberrations morphologiques et finalement la lyse cellulaire (Templin *et al.*, 1999). L'UDP-MurNAc-tripeptide peut ensuite rejoindre la voie métabolique par l'intermédiaire de MurF. Le tripeptide peut aussi être utilisé par la DL-carboxypeptidase MpaA qui clive alors le résidu terminal *meso*-A₂pm (Uehara and Park, 2003). Le dipeptide résultant L-Ala-D-Glu peut être

dégradé et converti en acides aminés de configuration L par les protéines YcjG et PepD (Fig. I.10).

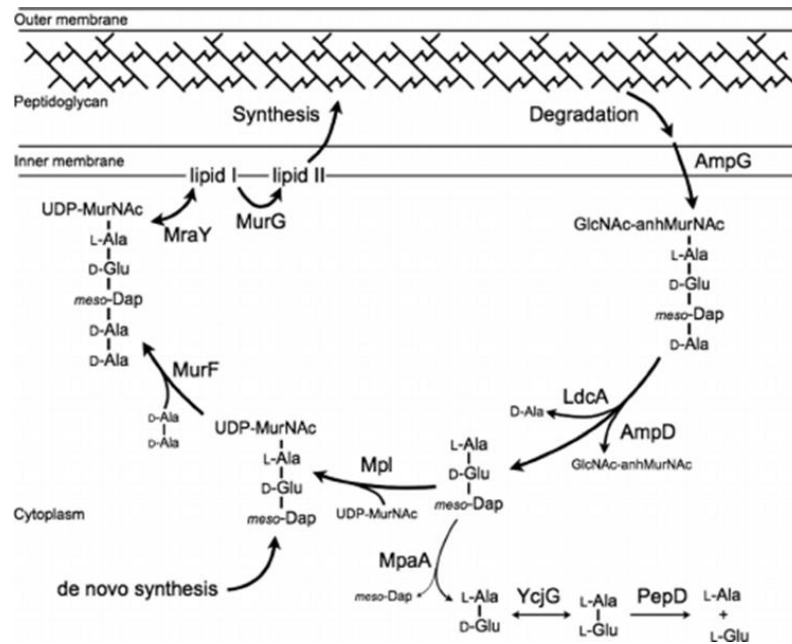


Figure I.10 : Voie de recyclage du tripeptide et des acides aminés issus de la dégradation du peptidoglycane. (Park and Uehara, 2008)

Le GlcNAc-1,6-anhydro-MurNAc est hydrolysé par la *N*-acétylglucosaminidase NagZ en GlcNAc et 1,6-anhydro-MurNAc (Vötsch and Templin, 2000). Le GlcNAc et le 1,6-anhydro-MurNAc sont convertis en GlcNAc-6-phosphate, qui peut être réutilisé. La kinase NagK catalyse la conversion directe du GlcNAc en GlcNAc-6-P tandis que le 1,6-anhydro-MurNAc est converti en MurNAc-6-phosphate par AnmK puis hydrolysé en GlcNAc-6-phosphate par l'éthérase MurQ (Park and Uehara, 2008). Le GlcNAc-6-phosphate est ensuite désacétylé par NagA pour obtenir le GlcN-6-phosphate (White and Pasternak, 1967). Celui-ci peut ensuite rejoindre soit la voie de synthèse du peptidoglycane par l'intermédiaire de GlmM soit la voie catabolique de la glycolyse par l'intermédiaire de NagB (Fig. I.11).

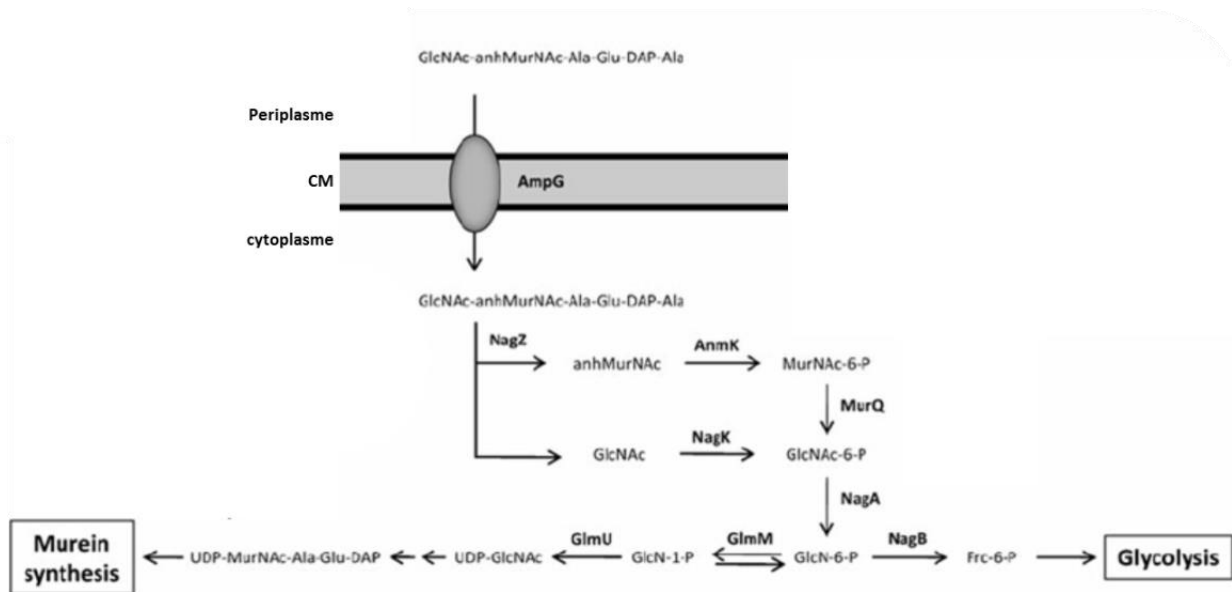


Figure I.11 : Voie de recyclage des sucres issus de la dégradation du peptidoglycane. (Reith and Mayer, 2011)

En présence d'antibiotiques à noyau β -lactame la synthèse du peptidoglycane est inhibée et mène à une activité hydrolytique incontrôlée. Les produits de dégradation contenant du 1,6-anhydroMurNAc sont alors transportés dans le cytoplasme par la voie de recyclage du peptidoglycane. Et chez certaines bactéries à Gram négatif comme *Enterobacter cloacae* ou *Citrobacter freundii*, le 1,6-anhydroMurNAc-tripeptide agit comme une molécule signal pour l'induction de la β -lactamase AmpC qui hydrolyse l'antibiotique (Jacobs *et al.*, 1994; Höltje *et al.*, 1994).

1.1.5. Synthèse du PG au cours du cycle cellulaire

Afin de croître et de se diviser les bactéries doivent augmenter la surface de leur peptidoglycane. Le défi pour la bactérie est alors de concilier la croissance du sacculus avec la conservation de l'intégrité et de la forme spécifique de ce dernier. Dans ce but, les enzymes responsables de la polymérisation du peptidoglycane doivent coopérer avec des hydrolases pour permettre l'insertion de nouvelles sous-unités dans le polymère (pré-) existant. Mais ce processus requiert aussi nombre de protéines impliquées dans la morphogénèse et dont la fonction exacte de beaucoup d'entre elles est encore mal connue. Selon ce modèle, les PBPs, les hydrolases et les protéines impliquées dans la morphogénèse cellulaire forment des complexes multiprotéiques dynamiques permettant la coordination de leurs activités dans l'espace et dans le temps. Ces complexes sont contrôlés dans le cytoplasme par des protéines du cytosquelette et également de l'extérieur par les protéines présentes dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Cabeen *et al.*, 2010; Paradis-Bleau *et al.*, 2010; Typas *et al.*, 2010).

1.1.5.1. Complexes de synthèse du peptidoglycane durant l'élongation et la division cellulaire

Le modèle actuel pour la synthèse du peptidoglycane durant le cycle cellulaire repose principalement sur des études du phénotype de souches mutantes, de localisations de protéines et d'interactions protéine-protéine. Celles-ci démontrent qu'il existe deux complexes de synthèse du peptidoglycane ; un actif durant la phase d'élongation et l'autre durant la division. Ces complexes sont appelés respectivement élongasome et divisome (Fig. I.13). Chaque complexe est composé de protéines cytoplasmiques du cytosquelette, de plusieurs protéines membranaires, de deux enzymes de la synthèse du lipide II (MraY et MurG), d'une flippase du lipide II, d'au moins une PBP de classe A et une de classe B, d'hydrolases du PG et de protéines régulatrices. Ces complexes sont dynamiques et formés par des protéines ou des sous-complexes de celles-ci qui présentent de multiples interactions relativement faibles entre elles, ce qui rend difficile leur isolement à partir de la cellule. Cependant, plusieurs interactions directes ont été identifiées entre ces protéines qui forment les complexes de synthèse du peptidoglycane chez *E. coli* (Vollmer *et al.*, 1999; Buddelmeijer and Beckwith, 2004; Bertsche *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007; Fraipont *et al.*, 2011; Banzhaf *et al.*, 2012; Typas *et al.*, 2012; Egan and Vollmer, 2013; Trip and Scheffers, 2015; Pazos *et al.*, 2017).

Dans le cadre de la division, la PBP bifonctionnelle PBP1b interagit avec elle-même, formant des dimères *in vivo* et *in vitro*, la forme dimérique montrant une augmentation de l'activité de synthèse comparée à la forme monomérique (Zijderveld *et al.*, 1991; Bertsche *et al.*, 2005). PBP1b interagit avec la PBP monofonctionnelle PBP3, ce qui a été démontré *in vitro* ainsi que dans la cellule. En effet, la présence de PBP3 est nécessaire au recrutement de PBP1b au site de division cellulaire, confirmant l'existence d'une interaction entre les deux PBPs au sein de la cellule. PBP1b interagit aussi avec l'hydrolase MltA via la protéine MipA et avec la protéine de la membrane externe LpoB qui augmente son activité (Vollmer *et al.*, 1999; Egan *et al.*, 2014). Quant à PBP3, protéine essentielle de la division, elle interagit avec FtsN une autre protéine essentielle de la division qui elle-même interagit et augmente l'activité de PBP1b probablement en stabilisant la forme dimérique de cette dernière (Müller *et al.*, 2007). De plus, la présence de FtsN est nécessaire à la localisation de l'amidase AmiC et de son activateur NlpD (Bernhardt and De Boer, 2003; Peters *et al.*, 2011). PBP3 interagit aussi avec la flippase potentielle FtsW et le sous-complexe FtsQLB dont le rôle n'est pas encore bien défini (D'Ulisse *et al.*, 2007; Fraipont *et al.*, 2011). Toutes ces connections indiquent que les deux PBPs ; PBP1b et PBP3 sont responsables de la majeure partie de la synthèse du peptidoglycane pour construire le septum tout en étant connectées à des hydrolases comme MltA et de manière indirecte aux amidases du septum. Les PBPs sont donc très intégrées dans le divisome qui comprend plus de douze protéines essentielles engagées dans un réseau complexe d'interactions protéine-protéine qui facilite la division (Egan and Vollmer, 2013)(Fig. I.12). La localisation du divisome repose sur deux protéines du cytosquelette, l'analogue de la tubuline FtsZ et l'analogue de l'actine FtsA. Les bactéries à Gram négatif doivent coordonner en plus l'invagination de la membrane externe avec la membrane cytoplasmique et la synthèse du

septum lors de la division cellulaire. Cette coordination est facilitée par le système Tol-Pal, un complexe trans-enveloppe et CpoB tous recrutés au site de division par les composants du divisome (Gerding *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2015).

Concernant l'élongation, la PBP bifonctionnelle PBP1a et la PBP monofonctionnelle PBP2 interagissent ensemble et se localisent le long de la paroi de la cellule (Banzhaf *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré *in vitro* qu'elles coopèrent dans la synthèse du nouveau peptidoglycane et son attachement au sacculus existant. De la même manière que dans le divisome, PBP1a interagit avec LpoA qui régule son activité. PBP2 interagit avec la protéine essentielle à l'élongation MreC qui interagit avec MreD et l'analogue de l'actine MreB (Kruse *et al.*, 2005; El Ghachi *et al.*, 2011; Contreras-Martel *et al.*, 2017) (Fig. I.13). Deux autres protéines essentielles à l'élongation ont été identifiées, RodA et RodZ. RodA est une protéine homologue à FtsW et transporterait le lipide II à travers la membrane. L'extrémité C-terminale de RodZ est localisée du côté périplasmique tandis que son domaine N-terminal cytoplasmique reconnaît la protéine MreB. Ainsi, la protéine RodZ servirait de pont entre les protéines périplasmiques et cytoplasmiques pour le contrôle de la biosynthèse du peptidoglycane (Bendezú *et al.*, 2009). L'élongasome comme le divisome contiennent les protéines MraY et MurG lesquelles synthétisent le lipide II à partir du précurseur cytoplasmique (Mohammadi *et al.*, 2007)(Fig. I.12).

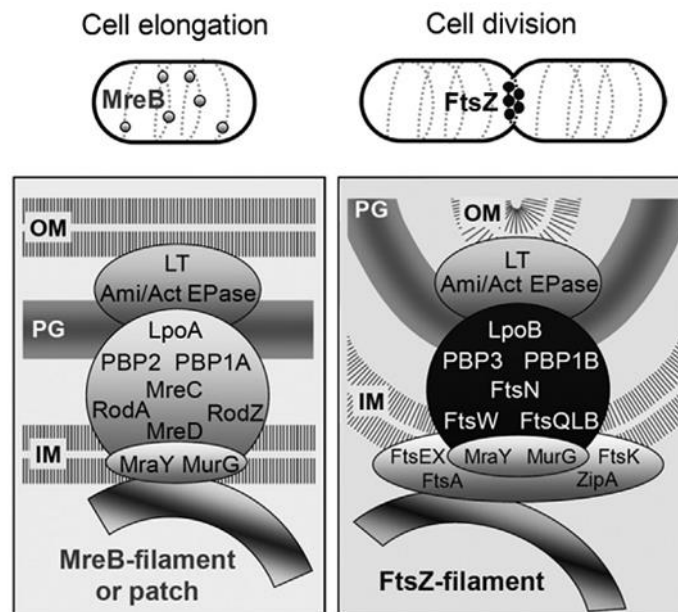


Figure I.12 : Représentation schématique des complexes de synthèse du peptidoglycane actifs durant l'élongation et la division cellulaire. Le complexe d'élongation cellulaire se localise sur la partie latérale de la paroi et dépend de MreB. Le complexe de division cellulaire se localise au centre de la cellule et dépend de FtsZ. IM : membrane cytoplasmique, PG : peptidoglycane, OM : membrane externe, Ami/ACT : amidases et leurs activateurs, LT : transglycosylase lytique, EPase : endopeptidase. (Vollmer, 2015)

Chez les bactéries de type bâtonnet, les complexes d'élongation élargissent la paroi cellulaire en de multiples sites de la paroi latérale. Avant la division cellulaire, il y a une période où l'élongation est dépendante de FtsZ et où la zone de croissance se situe au milieu de la cellule. Cette période est appelée élongation pré-septale. Cette étape peut être relativement courte

comme chez *E. coli* ou plus longue comme chez *Caulobacter crescentus* qui utilise ce mode d'élongation pour accroître une grosse partie de sa paroi latérale (De Pedro *et al.*, 1997; Aaron *et al.*, 2007). Les complexes de l'élongation pré-septale contiennent des éléments de l'élongasome et du divisome. Il est probable que FtsZ et les premières protéines qui viennent former le divisome conduisent l'élongation pré-septale en utilisant les complexes spécifiques à l'élongation du peptidoglycane (Vollmer, 2008; Typas *et al.*, 2012). Ce modèle est corroboré par l'identification d'interactions entre les composants des deux systèmes, c'est le cas des transpeptidases PBP2 et PBP3 et des protéines du cytosquelette MreB et FtsZ (Fenton and Gerdes, 2013; Van der Ploeg *et al.*, 2013). L'interaction entre FtsZ et MreB est essentielle pour la localisation des PBPs de la paroi latérale au site de division et pour la constriction cellulaire (Fenton and Gerdes, 2013).

1.1.5.2. Le modèle 3 pour 1

Comment les PBPs et les hydrolases du peptidoglycane, incorporées au sein du divisome et de l'élongasome, élargissent-elles la fine et simple couche de peptidoglycane chez *E. coli* ? Høltje propose un modèle dans lequel les PBPs et les hydrolases forment des complexes multi-enzymes qui élargissent la surface du sacculus par un mécanisme 3 pour 1 (Holtje, 1998). Dans ce modèle les PBPs synthétisent trois nouveaux brins de peptidoglycane pontés entre eux via leurs peptides et attachent ce nouveau matériel au sacculus existant. Simultanément, les hydrolases retirent un ancien brin ce qui permet l'insertion du nouveau triplet de brins de glycanes dans le sacculus préexistant (Fig. I.13). Ce modèle est en concordance avec les interactions observées entre les différentes enzymes du peptidoglycane. Enfin, des expériences de marquage du peptidoglycane montrent que durant la division, un tiers du peptidoglycane nouvellement synthétisé est rapidement dégradé (Uehara and Park, 2008).

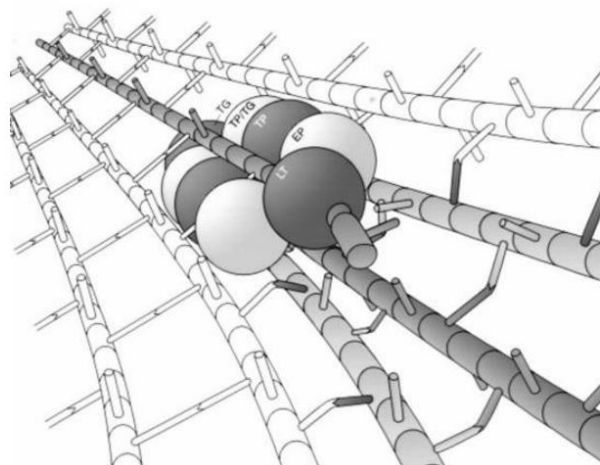


Figure I.13 : Représentation schématique du modèle de croissance trois pour un des bactéries Gram-négatives.
 TP : transpeptidase, TG : transglycosylase, EP : endopeptidase, LT : transglycosylase lytique (Holtje, 1998).

1.1.5.3. Régulation de la synthèse du peptidoglycane

Les éléments du cytosquelette régulent et positionnent les complexes de synthèse du peptidoglycane de l'intérieur de la cellule (Cabeen *et al.*, 2010) (Fig. I.12). Le cycle de polymérisation et de dépolymérisation de FtsZ est GTP-dépendant. La dynamique de FtsZ est également régulée par de multiples protéines (Adams and Errington, 2009; Egan and Vollmer, 2013). Les protéines FtsA et ZipA fixent les filaments de FtsZ à la membrane où ils forment un anneau au milieu de la cellule appelé anneau-Z (Erickson *et al.*, 2010) (Fig. I.14). La dynamique de FtsZ entraîne une force mécanique qui dirige la constriction de l'enveloppe bactérienne (Osawa *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2013). De la même manière, MreB est ancrée dans la membrane par RodZ et MreCD. Dans un premier temps, il a été rapporté que MreB formait des filaments hélicoïdaux sous la membrane cytoplasmique tout le long de la cellule mais des images en haute résolution ont ensuite montré des patchs dynamiques de MreB se déplaçant autour de la circonférence cellulaire perpendiculairement à l'axe latéral d'*E. coli* et *B. subtilis* (Fig. I.14B et D) (Jones *et al.*, 2001; Garner *et al.*, 2011; van Teeffelen *et al.*, 2011; Domínguez-Escobar *et al.*, 2011). Toutes ces études ont démontré que la structure formée par MreB est dépendante de la synthèse du peptidoglycane. MreB et les PBPs se déplacent donc de manière interdépendante, probablement dans la direction des chaînes de glycanes facilitant ainsi l'insertion du nouveau peptidoglycane.

Enfin certaines bactéries de forme incurvée possèdent un autre élément du cytosquelette, l'analogue du filament intermédiaire, la crescentine. La crescentine est responsable de la forme incurvée de *C. crescentus*, chez qui elle se localise sous forme de filaments le long de la membrane cytoplasmique du côté interne de la courbure de la cellule. Comme les autres éléments du cytosquelette, la crescentine exerce une force mécanique sur l'enveloppe cellulaire faisant croître la cellule avec une forme incurvée.

Selon ce modèle, la crescentine réduit la contrainte sur la paroi cellulaire au niveau de la courbure interne de la cellule, provoquant un taux réduit de synthèse de peptidoglycane sur ce côté comparé au côté extérieur de la courbure dépourvu de crescentine. Étonnamment, ce mécanisme fonctionne aussi sur des cellules normalement droites d'*E. coli* qui croît avec une forme courbée lorsque l'on y exprime la crescentine (Cabeen *et al.*, 2009).

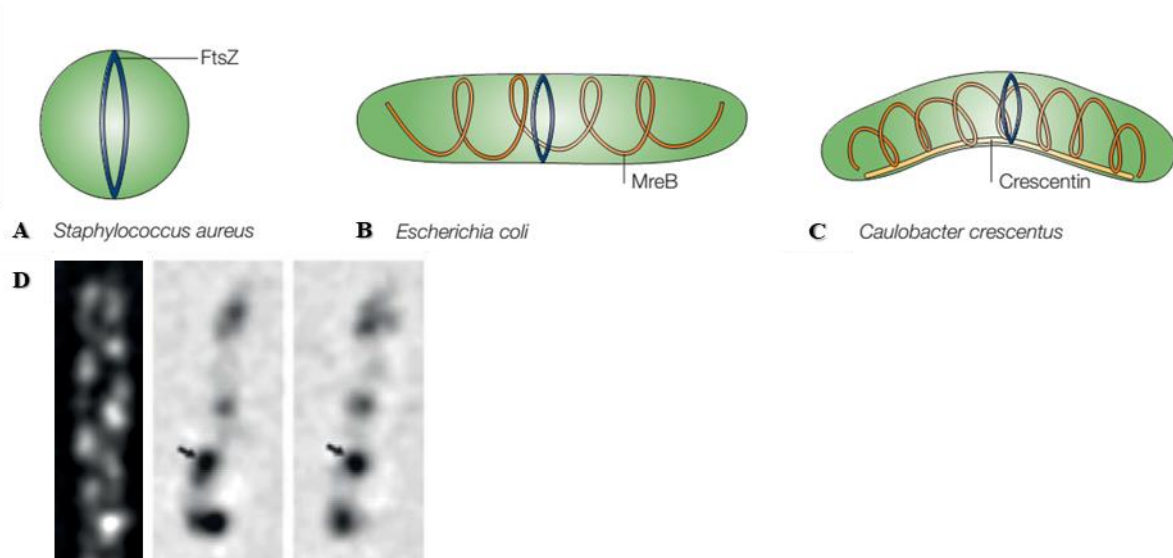


Figure I.14 : Différents éléments du cytosquelette bactérien. **A** : Représentation de l'anneau FtsZ au centre de la cellule. Certaines bactéries comme *S. aureus* ne possèdent pas d'autres éléments du cytosquelette. **B**. Lorsque l'analogue de l'actine MreB est présent les cellules peuvent prendre une morphologie en bâtonnet comme *E. coli*. **C**. *C. crescentus* contient en plus de FtsZ et MreB de la crescentine qui donne à la cellule une forme incurvée. **D**. Patches de MreB visualisés chez *B. subtilis* par TIRFM (total internal reflection fluorescence microscopy) (Cabeen *et al.*, 2009 ; Domínguez-Escobar *et al.*, 2011).

Chez *E. coli* et probablement chez les autres bactéries à Gram négatif, la synthèse du peptidoglycane est aussi régulée de l'extérieur du sacculus par les lipoprotéines de la membrane externe LpoA et LpoB (Paradis-Bleau *et al.*, 2010; Typas *et al.*, 2010). LpoA et LpoB interagissent spécifiquement avec PBP1a et PBP1b, respectivement, et stimulent leur activité *in vitro* (Fig. I.12). De plus, PBP1a et PBP1b ont besoin de la présence de leur protéine Lpo respective pour fonctionner dans la cellule. Les protéines Lpo ancrées dans la membrane externe doivent traverser la couche de peptidoglycane pour pouvoir atteindre et activer les PBPs. L'activation des PBPs serait donc un mécanisme pour combler le vide à des endroits où le peptidoglycane est moins dense permettant ainsi de produire une couche de peptidoglycane avec une densité homogène comme observé chez *E. coli* (Koch, 1998).

1.1.5.4. Synthèse du peptidoglycane et formes bactériennes

La forme qu'adopte la bactérie est intimement liée à la croissance de son peptidoglycane. En effet, la forme de l'enveloppe de la bactérie est déterminée par l'activité coordonnée des complexes de synthèse du peptidoglycane qui dirigent l'élongation ainsi que la division cellulaires (Margolin, 2009). Il existe une grande variété de formes que les bactéries peuvent adopter mais les plus communes sont les formes sphérique, ovoïde, en bâtonnet, incurvée, hélicoïdale ou encore filamenteuse (Young, 2006; Young, 2007).

Les bactéries sphériques ou coques comme *S. aureus* ne possèdent pas de protéine MreB et croissent exclusivement de manière FtsZ-dépendante par la synthèse de peptidoglycane au septum (Fig. I.15). Cette synthèse est alors responsable de la formation d'un nouvel hémisphère chez chaque cellule fille (Pinho and Errington, 2003; Zapun *et al.*, 2008). Des études phylogénétiques suggèrent que les coques ont évolué à partir de la forme en bâtonnet, en éliminant la machinerie requise pour l'élongation (Siefert and Fox, 1998). Les bactéries

ovoïdes comme *S. pneumoniae* ont en plus une croissance latérale indépendante de MreB (Fig. I.15). Le peptidoglycane est synthétisé au milieu de la cellule et principalement avant la division cellulaire. C'est cette synthèse qui est responsable de l'expansion longitudinale qui contribue à leur forme ovale (Daniel and Errington, 2003). Chez la bactérie à Gram positif *S. pneumoniae*, PBP2X et PBP2b incorporent le nouveau peptidoglycane respectivement au septum et au niveau de la paroi latérale (Morlot *et al.*, 2003; Zapun *et al.*, 2008). Les enzymes ou complexes responsables de la synthèse du peptidoglycane septal ou de la partie périphérique au septum, sont associées à FtsZ (Morlot *et al.*, 2003; Zapun *et al.*, 2008).

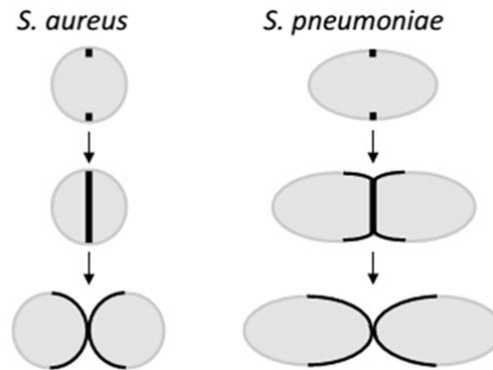


Figure I.15 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez les coques et ovocoques. L'ancien peptidoglycane est représenté en gris et le nouveau peptidoglycane est représenté sous forme de lignes noires. Les cellules sphériques de *S. aureus* se développent par synthèse au septum et clivage du septum de manière dépendant de FtsZ. Chez l'ovocoque *S. pneumoniae*, le peptidoglycane est synthétisé au septum et aux abords latéraux de celui-ci de manière dépendante de FtsZ (Derouaux *et al.*, 2013).

Concernant les bactéries de type bâtonnet comme *E. coli* ou *B. subtilis*, cette forme est obtenue grâce à la présence des deux complexes spécialisés dans l'élongation et la division (Fig. I.16). En effet, l'élongation chez *E. coli* a lieu par l'insertion du nouveau peptidoglycane le long de la partie cylindrique, dans un nombre limité de site (± 50) (den Blauwen *et al.*, 2008). De plus, la forme en bâtonnet d'*E. coli* peut être convertie en sphère sous l'effet d'antibiotiques β -lactamines comme le mécillinaam qui inhibe PBP2 ou en inactivant les gènes codant pour les protéines MreB, MreC, RodA, RodZ ou PBP2 (Normark *et al.*, 1969; Waxman and Strominger, 1983; Matsuzawa *et al.*, 1989; Wachi *et al.*, 1989; Kruse *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*, 2008).

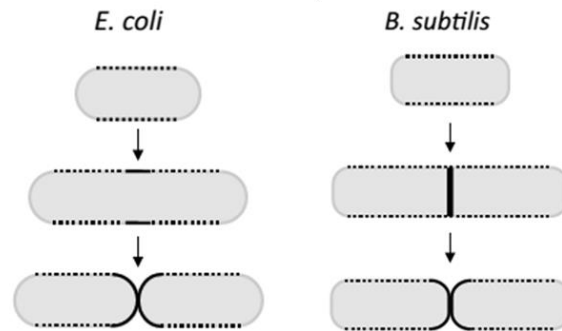


Figure I.16 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez *E. coli* et *B. subtilis*. L'ancien peptidoglycane est représenté en gris et le nouveau peptidoglycane est représenté sous forme de points ou lignes noires. Les bactéries en forme de bâtonnets comme *B. subtilis* et *E. coli* s'allongent en incorporant du nouveau peptidoglycane au niveau de leur partie cylindrique de manière MreB-dépendante. Chez *B. subtilis* la synthèse et le clivage du septum sont des événements distincts, alors que les deux processus se produisent simultanément chez *E. coli* entraînant une invagination durant la division. Chez *E. coli*, il y a aussi une élévation pré-septale au cours de laquelle la cellule s'allonge de manière dépendante de FtsZ au niveau du milieu de la cellule (Derouaux *et al.*, 2013).

Il existe cependant des bactéries comme les corynébactéries capables d'adopter la forme en bâtonnet tout en étant dépourvues des protéines MreB, MreC et MreD (Daniel and Errington, 2003). Chez *Corynebacterium glutamicum*, la protéine DivIVA conservée chez beaucoup de bactéries à Gram positif (comme *S. aureus*, *S. pneumoniae* et les Streptomyces), se localise au niveau des pôles cellulaires et déclenche une croissance latérale avec PBP1a, PBP1b et RodA (Valbuena *et al.*, 2007; Fiuza *et al.*, 2010) (Fig. I.17). DivIVA possède un domaine « coiled-coil » et présente une homologie avec la tropomyosine des eucaryotes. Elle est impliquée dans la croissance latérale et la formation du septum probablement en recrutant directement les PBPs (Margolin, 2009). *C. glutamicum* possède en plus une protéine du cytosquelette appelée RsmP dont la phosphorylation régule la croissance aux pôles (Fiuza *et al.*, 2010).

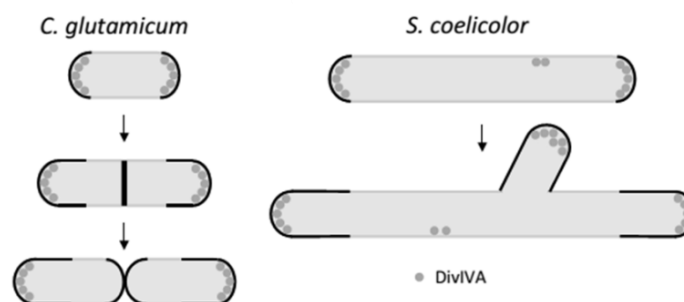


Figure I.17 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez *C. glutamicum* et *S. coelicolor*. L'ancien peptidoglycane est représenté en gris et le nouveau peptidoglycane est représenté sous forme de lignes noires. *C. glutamicum* n'a pas de protéine MreB et sa croissance latérale se fait aux pôles de manière DivIVA-dépendante et pour la division cellulaire au niveau du septum d'une manière dépendante de FtsZ. Les filaments de *S. coelicolor* croissent également par les pôles, cette espèce formant aussi des embranchements de manière DivIVA-dépendante (Derouaux *et al.*, 2013).

Un autre exemple est celui d'*Agrobacterium tumefaciens* dont l'élévation cellulaire est unipolaire et implique les protéines de la division (Fig. I.18). Effectivement, *A. tumefaciens* est dépourvue des protéines MreB, MreC, MreD, RodZ, RodA et PBP2 néanmoins la plupart des

éléments de la synthèse du peptidoglycane septal comme FtsA, FtsZ, PBP3, PBP1b, FtsW et FtsK sont conservés (Brown *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2014; Howell *et al.*, 2018). Les protéines FtsZ et FtsA s'accumulent au niveau du pôle de croissance durant l'élongation. FtsZ quitte ensuite, avant FtsA, pour commencer à former l'anneau-Z au site de division (Cameron *et al.*, 2014) (Fig. I.18A). Lorsque la croissance polaire se termine, on retrouve donc FtsZ, FtsA et la machinerie de synthèse du peptidoglycane relocalisé au site de division. Il a été récemment démontré que seul FtsZ était requis pour terminer la croissance cellulaire au pôle et initié la synthèse du peptidoglycane au septum (Howell *et al.*, 2018). L'identité du pôle de croissance est définie par les protéines PopZ et PodJ. En effet, PopZ se localise exclusivement au pôle de croissance et bascule directement après la division vers le nouveau pôle de croissance. PodJ quant à lui serait responsable de la transition du pôle de croissance vers un état inactif (ancien pôle de croissance) (Fig. I.18B). Initialement, PodJ se localise au niveau de l'ancien pôle de croissance mais au fur et à mesure de la progression du cycle cellulaire, il va s'accumuler au niveau du pôle en croissance (Fig.1.18B).

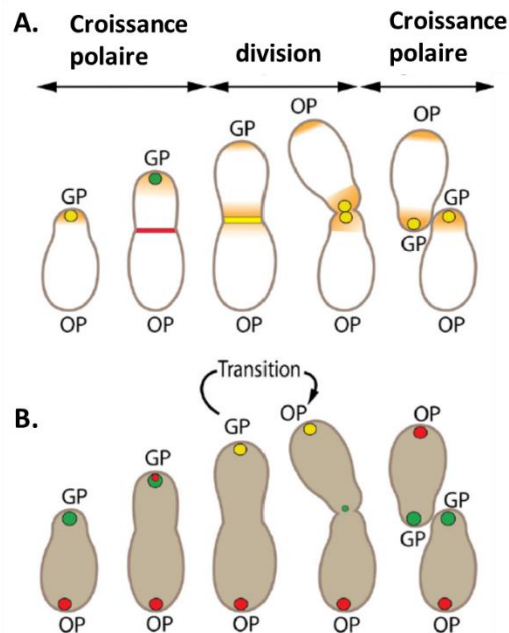


Figure I.18 : Formes et sites de croissance du peptidoglycane au cours du cycle cellulaire chez *A. tumefaciens*. **A.** FtsA et FtsZ co-localisent (jaune) au début du cycle cellulaire. FtsZ (rouge) quitte le pôle de croissance, avant FtsA (vert), pour commencer à former l'anneau-Z au site de division. FtsA vient ensuite se localiser avec FtsZ au septum (jaune). **B.** Localisation de PopZ (vert) et PodJ (rouge). La co-localisation est indiquée en jaune et la flèche indique la transition du pôle de croissance vers le pôle inactif (ancien pôle de croissance). **OP** : ancien pôle ; **GP** : pôle de croissance (Grangeon *et al.*, 2015).

Enfin, bien que la forme hélicoïdale soit fréquente chez les bactéries, les composants et mécanismes pour parvenir à une croissance hélicoïdale restent mal connus. Les bactéries à Gram négatif de l'ordre des spirochètes comme *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme, présentent un flagelle périplasmique essentiel non seulement à la mobilité mais aussi à la forme hélicoïdale de la cellule (Goldstein *et al.*, 1994). Le flagelle périplasmique pourrait générer la force nécessaire pour tordre la cellule en une forme hélicoïdale (Wolgemuth *et al.*, 2006). Il existe cependant certains spirochètes qui gardent leur forme hélicoïdale en absence de flagelle. La machinerie impliquée dans la synthèse du

peptidoglycane dans une enveloppe cellulaire hélicoïdale n'a pas encore été clairement identifiée (Ruby *et al.*, 1997). La ϵ -protéobactérie *H. pylori* colonise l'estomac de l'homme et est capable d'y induire des inflammations chroniques. Sa forme en hélice est importante pour sa pathogénicité et est probablement le résultat de trois processus morphologiques : une élongation, une courbure et une torsion cellulaire. La bactérie *H. pylori* possède les gènes des protéines typiques de l'élongation *mreB* et *mreC* mais elle est dépourvue de *mreD* et de *rodZ* (Margolin, 2009). Cependant, la protéine MreB n'est pas essentielle à la forme de la bactérie. Plusieurs protéines essentielles à la forme hélicoïdale de *H. pylori* ont été identifiées: les DD-endopeptidases Csd1 et Csd2, la DD-endopeptidase/DD-carboxypeptidase Csd3, les LD-carboxypeptidases Csd4 et Csd6 et les deux protéines dépourvues d'activité enzymatique Csd5 et Ccm (Bonis *et al.*, 2010; Sycuro *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Blair *et al.*, 2018). La protéine Ccm est une homologue de la bactofiline, un élément du cytosquelette capable de s'assembler sans cofacteur et largement répandu chez les bactéries (Kühn *et al.*, 2010). Csd1, Csd2 et Csd3 appartiennent à la famille des peptidases LytM et la délétion d'une ou plusieurs de ces protéines conduit à la perte de la forme de la bactérie. Il a été proposé que la courbure et la torsion de la cellule soient générées et maintenues par des clivages locaux dans le pontage du peptidoglycane catalysé par les protéines Csd1-4 et Csd6 et régulé par Ccm (Sycuro *et al.*, 2010; Chan *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015). Récemment, il a été démontré que Csd5 interagissait à la fois avec le peptidoglycane, la protéine MurF, l'ATP synthase et Ccm et que ces interactions favorisaient le maintien de la forme hélicoïdale (Blair *et al.*, 2018). Enfin quelques espèces de bactéries à Gram positif, du phylum des actinobactéries incluant les Streptomyces forment des ramifications ou des hyphes analogues aux champignons filamenteux. Les hyphes s'allongent par leurs pointes sans avoir besoin de MreB comme chez les corynébactéries. Les Streptomyces naissent à partir d'une spore et forment d'abord un mycélium végétatif. Ensuite, ils forment un mycélium ramifié aérien qui peut se différencier en chaînes de spores. Les ramifications requièrent la formation d'un nouveau pôle cellulaire dans la partie cylindrique du filament. La localisation de la protéine DivIVA dirige la formation de ce nouveau pôle de croissance cellulaire (Hempel *et al.*, 2008) (Fig. I.17). La courbure de la membrane au nouveau pôle peut être importante pour la stabilisation de DivIVA, comme c'est le cas chez *B. subtilis*, mais ne détermine probablement pas le site où le nouveau pôle est créé (Flärdh, 2010). La protéine RodA est essentielle pour la croissance des hyphes aériens et FtsW est requise pour la formation du septum pendant la sporulation (Mistry *et al.*, 2008). *S. coelicolor* possède trois protéines homologues de MreB, bien qu'aucune ne soit essentielle pour l'élongation cellulaire. MreB et Mbl se co-localisent au septum pendant la sporulation et sont nécessaires pour la synthèse de la paroi des spores (Heichlinger *et al.*, 2011).

1.1.6. Identité de la flippase de lipide II et rôle des protéines SEDS

Bien que la synthèse du peptidoglycane soit l'objet d'études intensives depuis plus de 50 ans, certaines étapes centrales n'ont pas encore été totalement élucidées. C'est notamment le cas de l'identité de la flippase du lipide II et de la protéine responsable de la synthèse du peptidoglycane indépendante des PBPs de classe A chez *B. subtilis* et les Entérocoques.

1.1.6.1. Identité de la flippase du lipide II

Après sa formation dans le cytoplasme, le lipide II doit être transporté à travers la membrane cytoplasmique pour servir de substrat, dans le périplasma, aux enzymes de synthèse du peptidoglycane. L'identité de la flippase du lipide II est sujet de controverse, deux protéines candidates ont été proposées : la protéine MurJ, appartenant à la super famille des transporteurs MOP (multidrug/oligo-saccharidyl-lipid/polysaccharide), et la protéine FtsW (et par extension les autres protéines de la famille SEDS comme RodA et SpoVE) (Ruiz, 2008). Lors d'une étude bio-informatique, MurJ est la première protéine à avoir été identifiée comme flippase du lipide II chez *E. coli*. MurJ est une protéine essentielle, composée de 14 segments transmembranaires et dont la délétion du gène conduit à l'accumulation de précurseurs lipidique dans le cytoplasme (Ruiz, 2008; Butler *et al.*, 2013; Butler *et al.*, 2014). Néanmoins, la délétion de l'ensemble des homologues de MurJ chez *B. subtilis* n'est pas létal (Fay and Dworkin, 2009). C'est ainsi que la protéine AmJ a été mise en évidence. En effet, l'expression de *amJ* est induite en l'absence de MurJ et dépend du facteur de stress sigma SigM (Helmann, 2002; Eiamphungporn and Helmann, 2008; Meeske *et al.*, 2015). Cependant, AmJ est une protéine, qui bien qu'elle soit capable de remplacer MurJ chez *E. coli*, ne présente aucune homologie de séquence ou de structure avec cette dernière (Meeske *et al.*, 2015). Des essais biochimiques *in vivo* utilisant la colicine M ont démontré que MurJ et Amj auraient une activité de flippase. Dans cette même étude, la délétion de FtsW dans une souche $\Delta rodA^*$ n'a pas montré d'effet sur la translocation du précurseur lipidique suggérant que RodA et FtsW ne sont pas nécessaires à ce processus (Sham *et al.*, 2014; Meeske *et al.*, 2015). Une souche $\Delta rodA^*$ est une souche dans laquelle la majeure partie de *rodA* est supprimée par la surexpression de l'opéron *ftsQAZ* (Kruse *et al.*, 2005). Des études fonctionnelles et structurales ont montré que MurJ présentait une cavité orientée vers l'extérieur, formée par les segments transmembranaires 1, 2, 7 et 8, contenant des résidus chargés essentiels pour l'activité de MurJ. La résolution de la structure cristallographique de MurJ a quant à elle révélé une cavité orientée vers l'intérieur, cette configuration se révèle être la configuration par défaut de la protéine, lui permettant de reconnaître son substrat et de se localiser (Kuk *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Récemment, une interaction directe entre le lipide II et MurJ a été mise en évidence *in vitro* par spectrométrie de masse, et le résidu A29 joue un rôle critique dans cette interaction et la localisation de la protéine (Liu *et al.*, 2017; Bolla *et al.*, 2018). Ces résultats pris ensemble suggèrent que le changement de configuration de MurJ permettrait le passage du lipide II à travers la membrane. La localisation de MurJ dépend de la synthèse du peptidoglycane et on retrouve donc la protéine sur la partie longitudinale ainsi qu'au septum de la bactérie. Sa localisation au site de division nécessite un divisome mature et dépend de l'activité des protéines PBP3 et FtsW ainsi que de la synthèse du lipide II (Liu *et al.*, 2017). FtsW comme son homologue RodA sont des protéines essentielles à la bactérie et nécessaires à la synthèse du peptidoglycane respectivement durant la division et l'élongation. La protéine FtsW est une protéine de 10 segments transmembranaires dont la spécificité dépendrait de la taille du substrat ce qui suggère un arrangement de la protéine sous forme de pore (Lara and Ayala, 2002; Mohammadi *et al.*, 2014). Lors d'essais *in vitro*, une activité flippase a été

démontrée pour FtsW et les résidus R145 et K153, deux résidus du segment 4, étaient essentiels pour l'activité de FtsW. Lors de ces tests, aucune activité n'a pu être détectée pour MurJ (Mohammadi *et al.*, 2014). Le rôle de FtsW reste controversé, cependant de nouveaux résultats portant sur l'activité de FtsW et de son homologue RodA semblent lui attribuer une toute nouvelle fonction (Meeske, Rodrigues, *et al.*, 2016; Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018).

1.1.6.2. Activité glycosyltransférase des protéines SEDS

Si MurJ est la flippase, quel est le rôle de FtsW et de son homologue RodA ? De récentes études démontrent que les protéines RodA et FtsW présentent une activité transglycosylase.

La réaction de transglycolysation est une étape périplasmique cruciale de la synthèse du peptidoglycane. Jusqu'à présent, seule la famille des GT51 est connue pour avoir une activité transglycosylase (les MTGs et les PBPs de classe A). Les PBPs de classe A sont considérées comme responsables de la majeure partie de la synthèse du peptidoglycane (voir 1.1.3). Cependant, *B. subtilis* qui ne possède pas de MTGs est capable de croître et de synthétiser du peptidoglycane (difficilement) en l'absence de l'ensemble de ses PBPs de classe A (McPherson and Popham, 2003). Ceci suggère l'existence d'une glycosyltransférase inconnue capable de remplacer l'activité des PBPs dans le quadruple mutant (toutes les PBPs de classe A étant inactives). Des observations similaires ont été faites chez deux espèces d'*entérocoques* (Arbeloa *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2009).

Il y a 30 ans des études chez *E. coli* avaient déjà suggéré que RodA pourrait être responsable de cette activité glycosyltransférase indépendante des PBPs de classe A. Cependant, ces observations avaient conduit à la conclusion que PBP2 possédait une activité transglycosylase stimulée par RodA (Ishino *et al.*, 1986). Récemment, des publications apportent plusieurs arguments pour proposer les protéines SEDS comme étant la glycosyltransférase manquante. Premièrement, l'identification de MurJ comme flippase du lipide II permet d'envisager un autre rôle pour FtsW et RodA (Meeske *et al.*, 2015). Ensuite, il a été démontré que RodA de *B. subtilis* possède une activité transglycosylase *in vitro* et que la surexpression de RodA restaure le phénotype du quadruple mutant chez *B. subtilis* (Meeske *et al.*, 2016; Emami *et al.*, 2017). Ces résultats pourraient expliquer la résistance de *B. subtilis* à la moénomycine, un antibiotique inhibiteur de l'activité glycosyltransférase (Welzel, 2005). En effet, chez *B. subtilis*, la résistance à la moénomycine dépend du facteur de stress SigM qui induit l'expression de la protéine RodA dont l'activité transglycosylase *in vitro* n'est pas affectée par la moénomycine (Mascher *et al.*, 2007; Eiamphungporn and Helmann, 2008; Meeske *et al.*, 2016). Parallèlement, chez *E. coli*, il a été démontré que RodA contribue à la synthèse du peptidoglycane durant la phase d'élongation cellulaire (Cho *et al.*, 2016). Néanmoins, la surexpression de RodA chez *E. coli* et de FtsW chez *B. subtilis* ne permettent pas de compléter le phénotype létal dû à la délétion des PBPs de classe A (Cho *et al.*, 2016; Emami *et al.*, 2017). Enfin dernièrement, l'activité de transglycolysation a été démontrée pour RodA d'*E. coli*, FtsW de *Streptococcus thermophilus*, FtsW de *S. aureus*, et FtsW de *Pseudomonas aereginosa* (Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018).

1.1.6.3. Un modèle en deux complexes de synthèses

L'utilisation de techniques de microscopie permettant une résolution spatio-temporelle élevée a démontré que MreB tourne autour de la cellule sous forme de patchs suivant une trajectoire en arcs. Ce mouvement est dépendant de l'activité de transpeptidation des PBP de classe B et de la présence de RodA mais pas de l'activité des PBP de classe A (Garner *et al.*, 2011; van Teeffelen *et al.*, 2011; Domínguez-Escobar *et al.*, 2011). Néanmoins, le modèle général de la synthèse du peptidoglycane propose que MreB serve de guide pour la synthèse par les PBP de classe A des chaînes de glycanes qui sont ensuite pontées par les PBP de classe A et B. Cependant, ces récentes expériences de fluorescence indiquent que MreB et les PBP de classe A opèrent dans deux complexes différents (Cho *et al.*, 2016)(Fig. I.19B). D'une part le complexe Rod (MreB-RodAZ-PBPb) et d'autre part les PBP de classe A (Fig. I.19). En effet, le complexe Rod et les PBP de classe B semblent se mouvoir le long d'une même trajectoire. Tandis que les PBP de classe A semblent se mouvoir en deux sous-populations ; l'une présentant un mouvement rapide et diffusif et l'autre se déplaçant plus lentement (Lee *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2016).

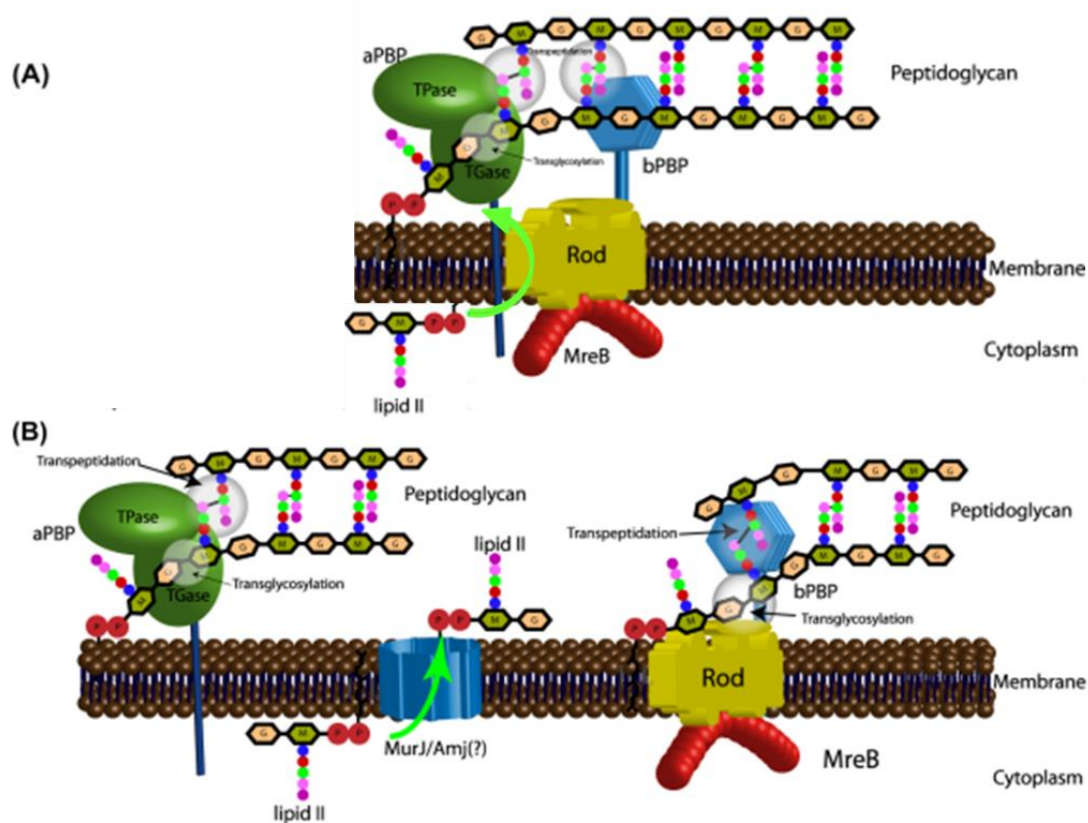


Figure I.19 : Les différents modèles de synthèse du peptidoglycane A. Modèle en un complexe de synthèse. RodAZ, MreB, les PBP de classe A et les PBP de classe B forment un complexe protéique. Ce complexe est guidé par MreB. Les PBP de classe A produisent des chaînes de glycanes via leur domaine transglycosylase tandis que les PBP de classe A et B pontent ces chaînes entre elles et au peptidoglycane préexistant. **B. Modèle en deux complexes de synthèse.** RodAZ, une PBP de classe B et MreB forment un complexe, alors que les PBP de classe A travaillent dans un cadre spatial et temporel différent. Les chaînes de glycanes sont produites par la transglycosylase RodA et sont pontées au peptidoglycane préexistant par la PBP de classe B. Les PBP de classe A présentent un mouvement en deux temps indépendant de MreB. Ces deux systèmes sont spatialement distincts, mais fonctionnellement interdépendants pour la synthèse de peptidoglycane (Zhao *et al.*, 2017).

Bien que spatialement indépendantes, les activités de synthèse des PBPs de classe A et du complexe Rod sont en quelque sorte synergiques et les deux complexes peuvent du moins transitoirement interagir ensemble. Puisqu'il a été démontré que l'inactivation de l'une ou l'autre conduit à la même diminution dramatique ($\pm 80\%$) de l'incorporation de nouveau peptidoglycane dans la paroi cellulaire (Cho *et al.*, 2016). De plus, une interaction directe a été identifiée entre PBP2 et PBP1a chez *E. coli* (Banzhaf *et al.*, 2012). Il est à noter que d'autres expériences ont identifié une possible interaction entre une sous-population de MreB et les PBPs de classe A, la sous population de MreB présentant comme les PBPs de classe A des mouvements diffus suivis de pauses (Kawai *et al.*, 2009; Billaudeau *et al.*, 2017). Cependant, le mouvement des PBPs de classe A pourrait être le simple reflet de leur mécanisme processif. Ces nouveaux résultats font l'objet d'intenses discussions et stimulent les activités de recherche dans ce domaine qui ne tardera pas à révéler la fonction exacte de ces familles de protéines dans le métabolisme du peptidoglycane

2. La division chez *E. coli*

2.1. Généralités

La division cellulaire chez *E. coli* est réalisée par le divisome, un complexe multiprotéique dynamique (Fig. I.20). Cette machinerie de division est constituée d'au moins vingt protéines distinctes impliquées dans diverses fonctions physiologiques telles que la ségrégation des chromosomes, l'invagination de l'enveloppe cellulaire, la synthèse du peptidoglycane au site de division ou encore la séparation des cellules filles. Parmi ces protéines, une dizaine sont essentielles (FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK, FtsQLB, FtsW, PBP3, FtsN) et interagissent entre elles et avec d'autres protéines qui ne sont pas strictement indispensables. Ces dernières jouent également un rôle important dans le processus de fission, mais sont individuellement non essentielles pour la survie cellulaire (de Boer, 2010; Lutkenhaus *et al.*, 2012; Egan and Vollmer, 2013).

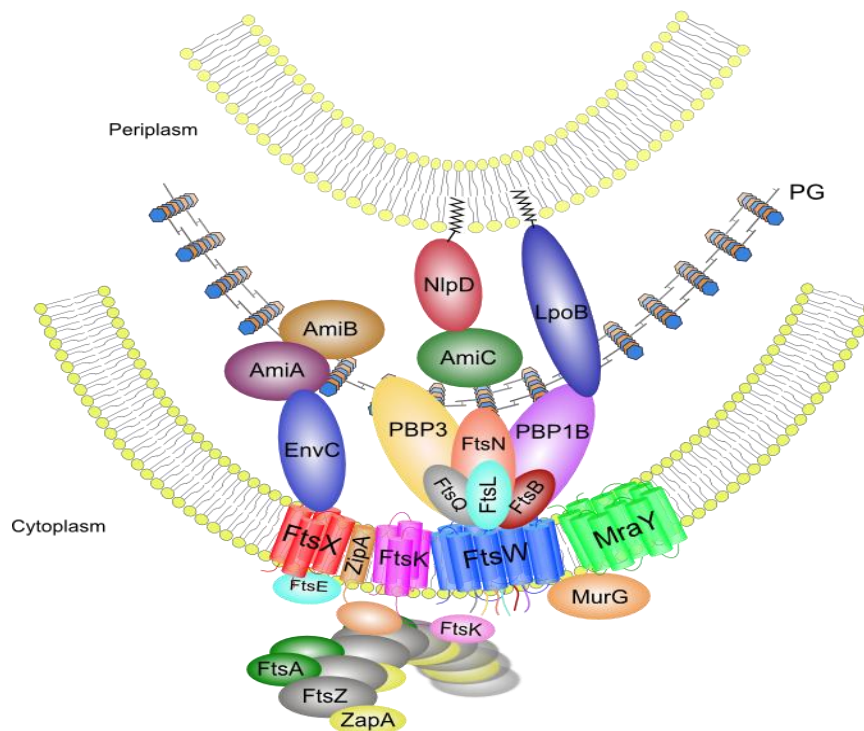


Figure I.20 : Représentation schématique des composants du divisome d'*E. coli*. (M. Rocaboy)

Les protéines du divisome s'assemblent au milieu de la cellule en deux étapes (Aarsman *et al.*, 2005) (Fig. I.21):

- La première étape est la polymérisation de la protéine FtsZ pour former un anneau contractile (appelé anneau-Z) et la localisation des protéines FtsA, ZipA, ZapA, ZapB, ZapC, ZapD et FtsEX. L'anneau-Z est ancré dans la membrane cytoplasmique grâce aux protéines FtsA et ZipA. Ce processus est régulé dans le temps et l'espace par l'occlusion nucléoïde (NO), l'oscillation des protéines (Min) et la liaison Ter (Lutkenhaus and Du, 2017).
- La deuxième étape est la maturation du divisome par le recrutement séquentiel et interdépendant des protéines dites tardives (FtsK, FtsQ/FtsL/FtsB, FtsW/PBP3, PBP1b, FtsN) pour initier la synthèse du septum et la constriction cellulaire. Il est à noter qu'une faible

quantité de FtsN est recrutée au cours de la première étape par son interaction avec FtsA (Yahashiri *et al.*, 2015) (Fig. I.21). Enfin, plusieurs protéines sont recrutées au moment ou après le début de la constriction cellulaire (Aarsman *et al.*, 2005; Lutkenhaus *et al.*, 2012). Parmi ces protéines, on retrouve les amidases AmiA, AmiB et AmiC ainsi que leurs activateurs EnvC et NlpD qui ensemble sont responsables de la séparation des deux cellules filles (Uehara *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012).

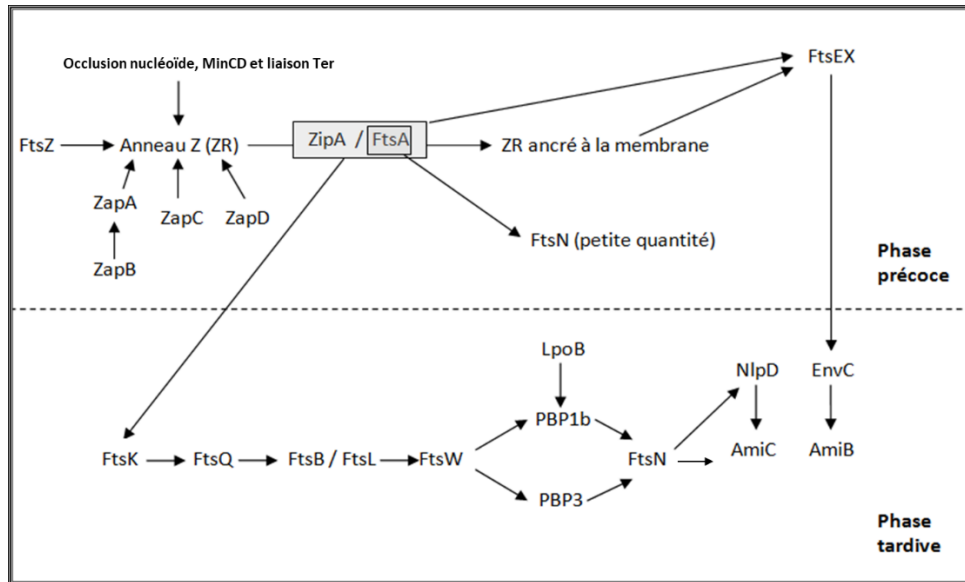


Figure I.21 : Représentation schématique du recrutement hiérarchique en deux phases (précoce et tardive) des composants principaux du divisome. Les flèches représentent généralement des interactions directes ou indirectes mises en évidence (Lutkenhaus *et al.*, 2012; Weiss, 2015; Buss *et al.*, 2015)

2.2. Formation de l'anneau FtsZ

FtsZ est une protéine homologue à la tubuline des eucaryotes qui est conservée chez la plupart des bactéries ainsi que dans les mitochondries et les chloroplastes des eucaryotes (Pla *et al.*, 1991; Imoto *et al.*, 2011). Elle appartient à une famille distincte de GTPases qui subissent une polymérisation dynamique dépendante de l'hydrolyse du GTP. Les monomères s'associent tête-bêche pour former des filaments (Fig. I.22B). Plusieurs structures cristallographiques de FtsZ provenant de différents organismes montrent une structure similaire composée de deux domaines globulaires reliés par une hélice alpha centrale (Löwe and Amos, 1998; Oliva *et al.*, 2007; Matsui *et al.*, 2012; Szwedziak *et al.*, 2012) (Fig. I.22A). Le domaine N-terminal est le domaine qui lie le GTP et le domaine C-terminal interagit avec le domaine N-terminal d'un monomère adjacent induisant ainsi l'hydrolyse du GTP (Romberg and Levin, 2003)(Fig. I.22C). Enfin, on observe un long segment C-terminal qui interagit avec d'autres protéines (Erickson *et al.*, 2010). En fait, le segment C-terminal de FtsZ est composé d'une longue séquence non conservée (± 50 acides aminés chez *E. coli*) suivie par une petite région conservée de 14 résidus appelée CCTP (conserved C-terminal peptide) (Du *et al.*, 2015). Cette région permet à FtsZ d'interagir avec nombre de ses partenaires comme les protéines d'ancrage ZipA et FtsA ou encore les régulateurs spatiaux MinC/MinD et SlmA (Ma and Margolin, 1999; Haney *et al.*, 2001)(Fig. I.22A).

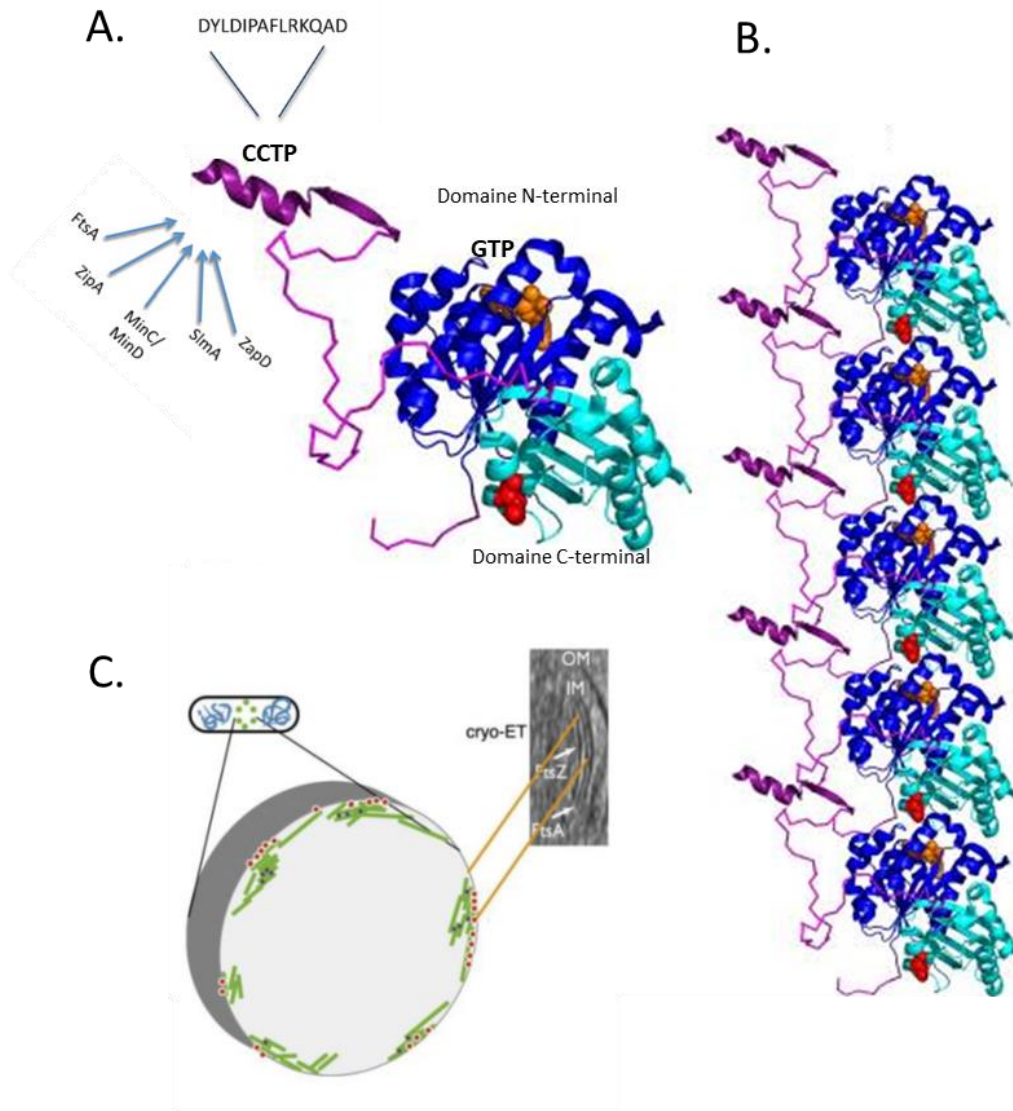


Figure I.22 : Structure de FtsZ et de l'anneau-Z. **A. Structure d'un monomère de FtsZ de *P. aeruginosa*.** Le domaine globulaire comprend deux domaines représentés en bleu (domaine N-terminal) et Cyan (domaine C-terminal). Le GTP est représenté en orange dans le domaine N-terminal. FtsZ comprend une petite région conservée de 14 résidus en C-terminal appelée CCTP permettant à FtsZ d'interagir avec certains de ses partenaires. **B. Filament de FtsZ.** Les monomères de FtsZ s'assemblent en tête-bêche pour former un filament de FtsZ. **C. Ultrastructure de l'anneau-Z.** Modèle de la disposition des filaments de FtsZ sous forme de patches, attachés à la membrane (rouge) et rassemblés par les protéines Zaps (mauve). A droite, image cryo-ET de *E. coli* montrant les filaments de FtsZ et FtsA au niveau de la membrane. (Erickson *et al.*, 2010; Haeusser and Margolin, 2016).

Il a été montré que l'affinité du CCTP pour les protéines d'ancrage FtsA et ZipA augmentait avec la polymérisation de FtsZ, plaçant les filaments au niveau de la membrane et les monomères dont le GTP a été hydrolysé dans le cytoplasme (Du *et al.*, 2015). La concentration *in vivo* en FtsZ est d'environ 4,5 μM et la concentration critique de polymérisation est proche de 1 μM (Mukherjee and Lutkenhaus, 1998; Chen and Erickson, 2005). Ce qui implique une régulation de la polymérisation de FtsZ par plusieurs mécanismes dont certains font appel à des protéines antagonistes comme MinC/MinD ou SlmA qui interagissent directement avec le CCTP. L'anneau-Z apparaît comme une structure discontinue constituée de zones patches de forte concentration séparées par des régions plus minces de faible concentration (Rowlett and Margolin, 2014) (Fig. I.22C).

2.2.1. Ancrage dans la membrane de l'anneau-Z

La formation de l'anneau FtsZ dépend de la polymérisation de FtsZ mais aussi de son ancrage au niveau de la membrane cytoplasmique par les protéines FtsA et ZipA. Les deux protéines sont nécessaires au recrutement des protéines de la phase de maturation mais la présence d'une des deux suffit à lier l'anneau-Z à la membrane (Pichoff and Lutkenhaus, 2002). La protéine FtsA après FtsZ est la protéine de la division la plus conservée au sein des bactéries. Elle se lie à la membrane par une hélice C-terminale amphipathique et appartient à la superfamille des ATPases qui inclut l'actine, la protéine « heatshock » Hsp70 et des hexokinases. La structure de FtsA de *Thermotoga Maritima* a été déterminée et a permis de montrer l'homologie structurale entre FtsA et l'actine (van den Ent and Löwe, 2000). Cependant, FtsA possède un domaine supplémentaire (domaine 1C) impliqué dans l'interaction avec la PBP3 et FtsN (Corbin *et al.*, 2004; Rico *et al.*, 2010; Busiek *et al.*, 2012). Malgré cette différence structurale, la protéine forme des filaments semblables à ceux de l'actine, il a été suggéré que l'anneau-Z est relié à la membrane par un anneau-A formé de polymères de FtsA (Szwedziak *et al.*, 2012) (Fig. I.22C). ZipA quant à elle est ancrée dans la membrane par un segment transmembranaire qui est suivi d'une longue jonction aboutissant à un domaine globulaire qui lie le CCTP de FtsZ (Hale and De Boer, 1997) (Fig. I.23).

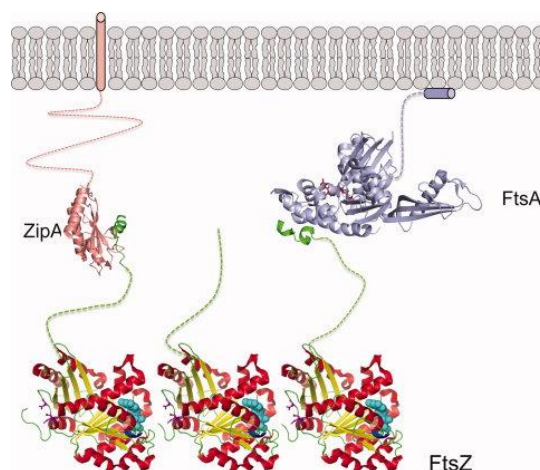


Figure I.23 : Ancrage de FtsZ à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de FtsA et ZipA.
(Lutkenhaus *et al.*, 2012)

2.2.2. Stabilisation de l'anneau-Z, les protéines Zaps

Finalement, ces filaments de FtsZ liés à la membrane se regroupent pour former l'anneau-Z au centre de la cellule à l'aide des protéines Zaps. Les quatre protéines ZapA, ZapB, ZapC et ZapD sont toutes présentes chez les gamma protéobactéries alors que seules ZapA et ZapD sont présentes chez les firmicutes et que les beta protéobactéries ne possèdent que ZapD (Natale *et al.*, 2013). Les protéines ZapA, ZapC et ZapD se lient aux filaments de FtsZ alors que ZapB n'interagit pas directement avec FtsZ mais interagit avec ZapA (Gueiros-Filho and Losick, 2002; Mohammadi *et al.*, 2009; Dajkovic *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 2011; Durand-Heredia *et al.*, 2012; Galli and Gerdes, 2012). La perte des trois protéines qui interagissent directement avec FtsZ conduit à une augmentation de la longueur des cellules et une lyse éventuelle.

Cependant, la perte d'une seule des trois a un effet moindre indiquant une certaine redondance de fonction (Durand-Heredia *et al.*, 2012). ZapA, ZapC et ZapD stabilisent les filaments de FtsZ par différents mécanismes (Fig. I.24). ZapA forme des dimères et des tétramères et regroupe les filaments en interagissant avec les côtés latéraux de ceux-ci (Pacheco-Gómez *et al.*, 2013). ZapD forme un dimère qui lie les CCTPs de filaments adjacents (Durand-Heredia *et al.*, 2012). Enfin, ZapC reste sous forme de monomère mais présente deux sites uniques de liaison pour le domaine globulaire de FtsZ (Schumacher *et al.*, 2016).

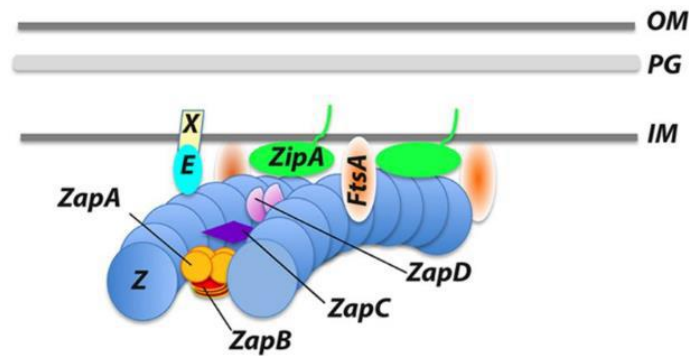


Figure I.24 : Interaction des protéines Zaps avec les filaments de FtsZ. (Huang *et al.*, 2013)

2.2.3. Rôles de l'anneau-Z

Le premier rôle de l'anneau-Z est de permettre le recrutement au site de division de l'ensemble des protéines qui forment le divisome. En plus de ce rôle bien caractérisé, la polymérisation et l'assemblage des filaments FtsZ pourraient fournir la force nécessaire à la constriction de la cellule (Osawa *et al.*, 2008; Erickson *et al.*, 2010). Deux modèles ont été proposés pour expliquer la capacité contractile de FtsZ : le glissement et le plissement (Erickson, 2009). Dans le modèle du glissement, les filaments FtsZ formés à la surface interne de la membrane cytoplasmique interagissent latéralement et glissent sur leurs longueurs entraînant une condensation des filaments fournissant une force de constriction (Lan *et al.*, 2009). Dans ce modèle, l'hydrolyse du GTP ne contribue pas directement à générer la force de constriction mais facilite l'échange des monomères. Dans le modèle de plissement, l'hydrolyse du GTP en GDP entrainerait un changement de courbure des filaments de FtsZ. Les filaments de FtsZ étant reliés à la membrane, le changement de position de FtsZ entraîne un pincement de la membrane (Fig. I.25A) (Lu *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013).

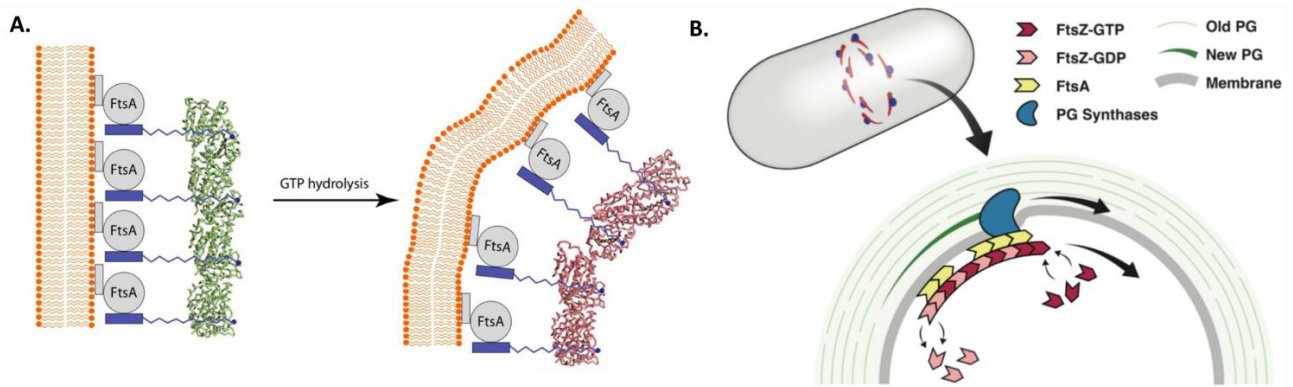


Figure I.25 : Mécanisme de constriction et modèle du roulement. A. Mécanisme proposé pour la constriction cellulaire. Constriction dépendante de FtsA et du changement de conformation de FtsZ lors de l'hydrolyse du GTP (Li *et al.*, 2013). **B. Modèle du roulement des filaments de FtsZ couplé à la synthèse du peptidoglycane.** L'anneau-Z schématiquement représenté par de nombreuses unités de FtsAZ effectue un roulement autour du site de division tirant ainsi le complexe de synthèse du peptidoglycane (Bisson-Filho *et al.*, 2017).

Cependant, l'anneau-Z se désassemble entièrement avant la fin de la constriction impliquant l'existence d'autres facteurs lors de la dernière partie de celle-ci (Söderström *et al.*, 2014). La synthèse du peptidoglycane jouerait également un rôle dans la constriction, la synthèse pouvant être un facteur limitant cette dernière. Néanmoins, deux nouvelles études indiquent que les filaments de FtsZ servent de plateforme sous la forme d'un « tapis roulant » à la machinerie de synthèse du peptidoglycane, ce mouvement conduisant l'insertion processive du peptidoglycane au septum (Bisson-Filho *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017) (Fig. I.25B).

2.2.4. Localisation de FtsZ au niveau du site de division

Il est nécessaire que l'anneau FtsZ soit correctement positionné au centre de la cellule. Chez *E. coli*, l'assemblage du divisome prend place au centre de la cellule avec une précision remarquable de $\pm 2\%$ générant ainsi deux cellules filles identiques. Ce niveau de précision suggère l'existence de multiples mécanismes de régulations (Fig. I.26). Ceux-ci pouvant être soit positifs en incitant la polymérisation de FtsZ au centre de la cellule soit négatifs s'ils empêchent la formation de l'anneau à des emplacements cellulaires aberrants comme au niveau des pôles cellulaires ou du chromosome. Chez *E. coli*, trois mécanismes ont été identifiés : deux négatifs, l'occlusion nucléoïde (NO) et le système Min (Min C/D) et un positif, la « liaison Ter ».

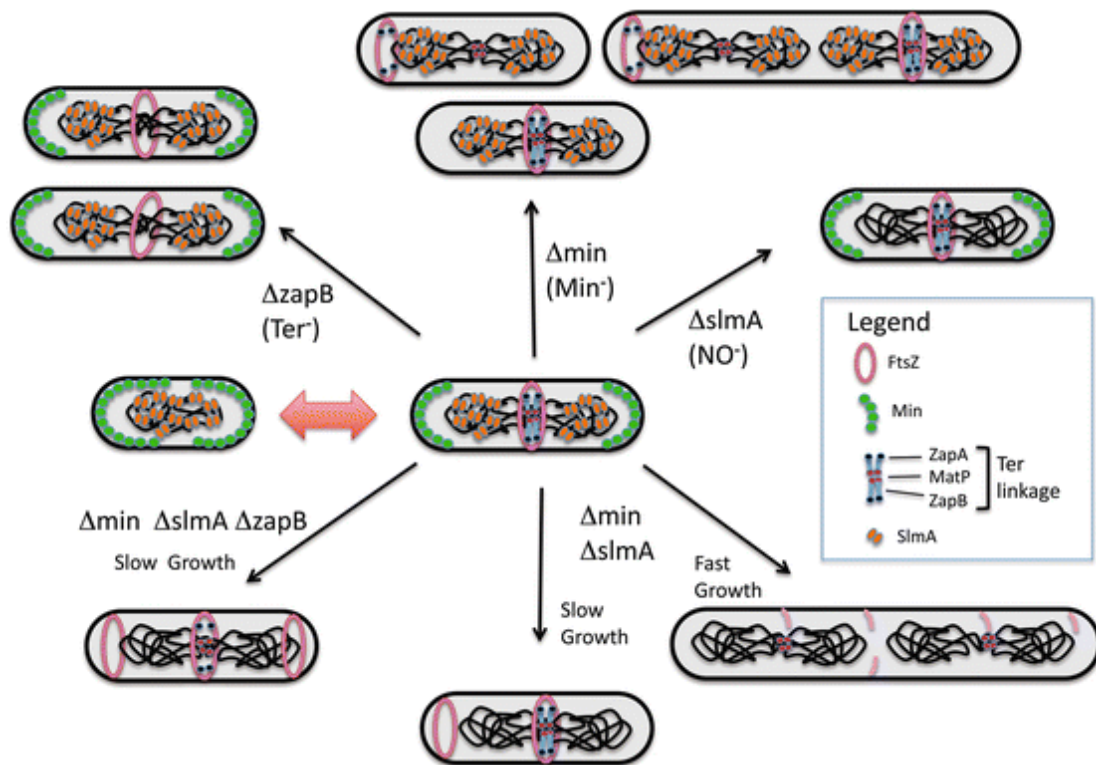


Figure I.26 : Régulation spatiale de l'anneau-Z. Trois systèmes contribuent à la régulation spatiale de l'anneau-Z ; Min, NO et la liaison Ter et leur influence est révélée par l'inactivation d'un système seul ou en combinaison. Dans des conditions de croissance normales, l'inactivation de Min entraîne un phénotype sévère avec des minicellules et des cellules de longueur hétérogène contenant des nucléoïdes. Alors qu'un phénotype plus subtil résulte de la perte de la liaison Ter (*ΔzapB*) et aucun avec la perte de NO (*ΔslmA*). Le phénotype dû à la suppression de deux ou plusieurs des systèmes dépend du taux de croissance. À un taux de croissance rapide, la perte de Min et SlmA conduit à une filamentation létale alors qu'à faible taux de croissance les cellules survivent mais présentent un anneau-Z central et un polaire. La perte des trois systèmes conduit à un anneau-Z polaire supplémentaire (Lutkenhaus and Du, 2017).

2.2.4.1. Occlusion du nucléoïde

L'occlusion des nucléoïdes est un mécanisme de défense qui empêche le chromosome d'être divisé par le septum de division. La protéine SlmA se lie sur des sites spécifiques de l'ADN répartis partout sur le chromosome à l'exception de la région Ter, connue pour être la dernière à être transférée dans les cellules filles lors du processus de division (Niki *et al.*, 2000). Une fois la protéine SlmA liée à l'ADN, celle-ci est capable d'interagir avec FtsZ pour inhiber sa polymérisation (Tonthat *et al.*, 2011; Tonthat *et al.*, 2013) (Fig. I.27C). La synchronisation de la croissance cellulaire et de la ségrégation des chromosomes laisse une région au centre de la cellule présentant peu d'ADN et donc peu de SlmA, rendant favorable l'assemblage de l'anneau-Z (Lutkenhaus, 2007). Cependant le système d'occlusion du nucléoïde ne protège pas les pôles de la cellule, la polymérisation de l'anneau-Z aux pôles est inhibée par le système Min.

2.2.4.2. Système Min

Le système Min est composé des protéines MinC, MinD et MinE qui ensemble forment un système oscillant d'un pôle à l'autre. Cette oscillation est générée par le couple MinD/E tandis que MinC est responsable de l'inhibition de la formation de l'anneau FtsZ. MinC est composée

de deux domaines interagissant tous deux avec FtsZ : un domaine N-terminal responsable de l'inhibition de la polymérisation de FtsZ et un domaine C-terminal empêchant les interactions latérales entre protofilaments de FtsZ. C'est ce domaine qui est aussi responsable de l'interaction avec la protéine MinD. Celle-ci est une ATPase qui s'associe à la membrane cytoplasmique et à MinC sous forme de dimère (Hu *et al.*, 1999; Hu and Lutkenhaus, 2003).

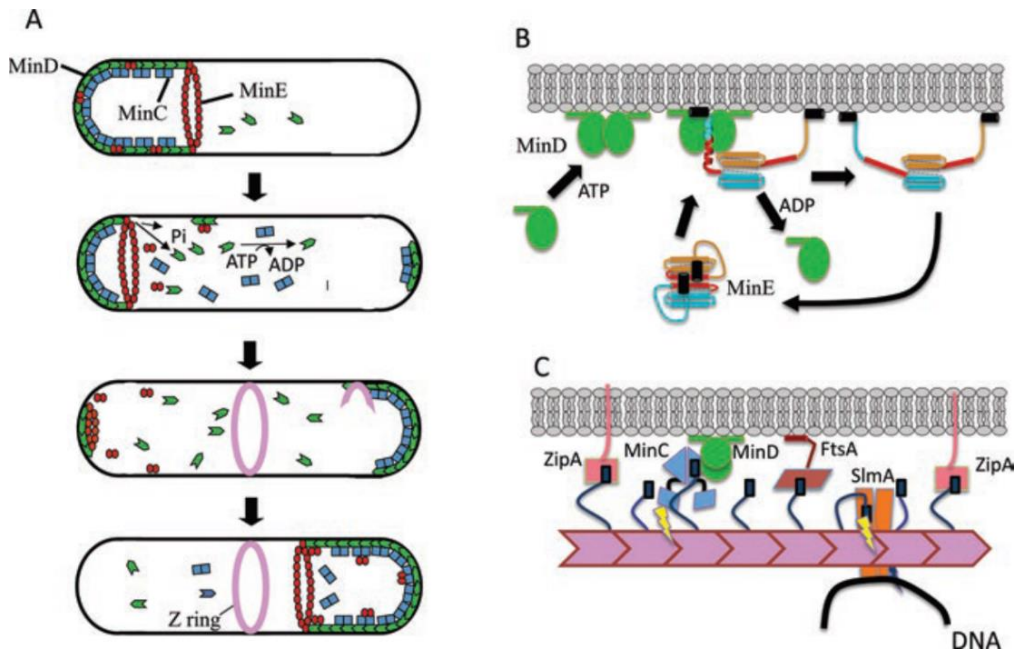


Figure I.27 : Système Min. A. Mécanisme d'oscillation des protéines Min. B. Représentation de l'interaction dynamique entre MinD, MinE et la membrane. L'hydrolyse de l'ATP par MinD est stimulée par MinE. C. Représentation schématique de l'action des antagonistes de FtsZ, MinC/D et SlmA. Ces antagonistes sont recrutés sur le filament de FtsZ en interagissant avec le domaine CCTP de FtsZ qui ne peut plus se lier aux protéines d'ancrage (Lutkenhaus and Du, 2017).

La troisième protéine du système, MinE entre alors en compétition avec MinC pour interagir avec MinD-ATP et stimule l'activité ATPase de MinD. L'hydrolyse de l'ATP par MinD provoque la dissociation du dimère, la protéine perd alors son affinité pour la membrane ainsi que pour MinC et MinE. Le relargage des protéines Min à un pôle crée un gradient de concentration qui engendre un flux, partant du pôle initialement occupé vers le pôle libre, dans lequel MinD échange son ADP pour un ATP, s'insère dans la membrane, recrute MinC et MinE et ainsi de suite. C'est de ce processus que résulte l'oscillation permettant l'inhibition de la formation de l'anneau FtsZ aux pôles cellulaires et une concentration minimale de MinC au centre de la cellule favorisant la localisation de FtsZ au centre de la cellule (Raskin and De Boer, 1999). Enfin, MinD a la capacité de se lier à l'ADN ce qui permettrait un déplacement des chromosomes dupliqués vers les pôles (Di Ventura *et al.*, 2013).

2.2.4.3. « Liaison Ter »

Des travaux chez *E. coli* et *B. subtilis* ont démontré que dans certaines conditions, en l'absence des deux systèmes de régulation négative (Min et NO) l'anneau-Z se place au centre de la cellule avec une bonne précision mais une efficacité réduite (Rodrigues and Harry, 2012; Bailey *et al.*, 2014) (Fig. I.26). C'est ainsi qu'un mécanisme de régulation positive impliqué dans le

recrutement de la protéine FtsZ au centre de la cellule a pu être mis en évidence (Bailey *et al.*, 2014; Buss *et al.*, 2015). Ce troisième mécanisme contribue au positionnement de l'anneau-Z en fournissant un lien physique entre celui-ci et le chromosome (Mannik *et al.*, 2012) (Fig. I.28). La région terminale du chromosome (*ter*) est la dernière à être répliquée et séparée. Elle migre du pôle vers le centre de la cellule au moment de la mise en place du septum de division (Espeli *et al.*, 2012). L'organisation du macrodomaine Ter est sous le contrôle de la protéine MatP (macrodomaine ter protéines) qui se fixe spécifiquement à des séquences motifs de 13 pb appelés sites *matS* et présents uniquement dans Ter. MatP se fixe à l'ADN sous forme de dimère, via son domaine N-terminal, et tétramérise via son domaine C-terminal. La tétramérisation est stimulée par la liaison à l'ADN et permet le pontage de deux sites *matS* distants entraînant la compaction du macrodomaine Ter (Mercier *et al.*, 2008; Dupaigne *et al.*, 2012). MatP interagit aussi avec ZapB qui lui-même interagit avec ZapA qui à son tour interagit avec FtsZ (Buss *et al.*, 2015) (Fig. I.28). La liaison Ter aide l'anneau-Z à se positionner au centre de la cellule et synchronise la division avec la ségrégation de l'ADN, notamment par l'interaction entre MatP et FtsK (Stouf *et al.*, 2013; Bailey *et al.*, 2014; Buss *et al.*, 2015) (Fig. I.28 et I. 34B).

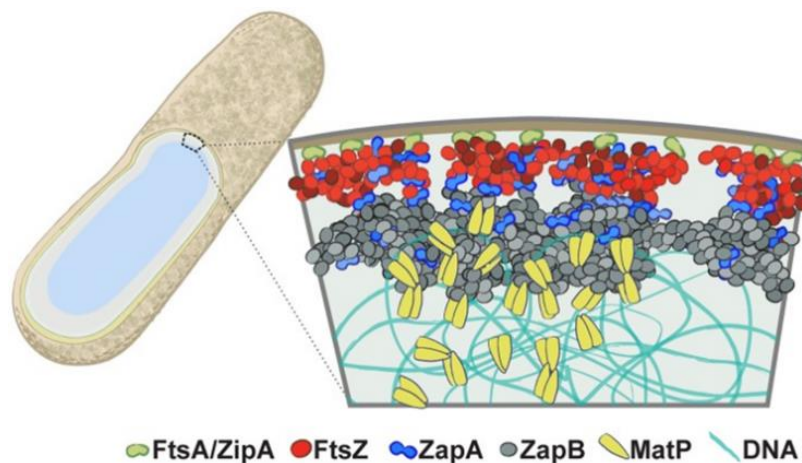


Figure I.28 : Schéma illustrant l'arrangement radial de FtsA / ZipA-FtsZ-ZapA-ZapB-MatP. FtsA (vert) et ZipA (orange) attachent FtsZ (rouge) à la membrane interne. ZapA (bleu) imite FtsZ mais peut dévier, en interagissant avec ZapB ou d'autres protéines membranaires. La grande couche interne de ZapB (grise) s'associe indirectement à FtsZ via ZapA, et est ancrée sur le chromosome grâce à ses associations avec MatP (jaune) (Buss *et al.*, 2015).

2.2.5. FtsEX

FtsE et FtsX possèdent des caractéristiques communes aux ABC (ATP binding cassette) transporteurs (Schmidt *et al.*, 2004). L'homologue le plus proche de celui-ci est le système LolCDE, qui extrait les lipoprotéines de la membrane cytoplasmique pour les transférer vers la membrane externe (Narita and Tokuda, 2006). FtsE est le composant ABC et est associée avec la membrane cytoplasmique via une interaction avec FtsX qui est le composant transmembranaire (Gill and Salmond, 1987; De Leeuw *et al.*, 1999). FtsEX se localise relativement tôt au site de division et sa localisation dépend des protéines FtsZ, FtsA et ZipA (Schmidt *et al.*, 2004). Il semble jouer trois rôles lors de la division cellulaire dont deux sont essentiels (Corbin *et al.*, 2007). En effet, la présence de FtsEX est essentielle au recrutement

des protéines de la phase de maturation et son activité ATPase est nécessaire pour l'initiation de la constriction (Arends *et al.*, 2009). Des données récentes indiquent que FtsEX réalise ces deux fonctions en modulant l'activité de FtsA, peut-être en modifiant son état de polymérisation (Du *et al.*, 2016). En plus, FtsEX recrute également la protéine périplasmique EnvC dont elle module l'activité. Ensemble, elles activent alors AmiA et AmiB, cette étape nécessitant l'hydrolyse d'ATP par FtsE (Yang *et al.*, 2011). Ainsi, FtsEX couple l'hydrolyse de l'ATP dans le cytoplasme au début de la constriction et à la séparation des cellules filles par l'action des amidases sur le peptidoglycane septal.

2.3. Maturation du divisome

Une fois l'anneau-Z formé, avant l'assemblage complet du divisome et le début de la division, un laps de temps d'environ un demi cycle de division est observé (Aarsman *et al.*, 2005; Gamba *et al.*, 2009; Goley *et al.*, 2011). Pendant cette période, l'ensemble des protéines dites tardives vont être recrutées (Fig. I.21). Cette deuxième étape, appelée maturation du divisome, conduira à une machinerie de division fonctionnelle (Fig. I.34B). La transition entre les deux modes de synthèse du peptidoglycane (latéral pour l'élongation et septale pour la division) est progressive et les deux mécanismes interagissent entre eux pour favoriser la division cellulaire (Voir 1.1.5.1). Les protéines de la phase de maturation du divisome seront décrites dans leur ordre de recrutement (Fig. I.21).

2.3.1. FtsK

FtsK est une protéine essentielle de la division, elle est impliquée dans la décaténation et la ségrégation des chromosomes (Yu *et al.*, 1998). Elle est composée de deux domaines reliés par une longue jonction (Dorazi and Dewar, 2000). Le domaine N-terminal se compose de quatre segments transmembranaires critiques pour la localisation de FtsQLB et des protéines suivantes (Wang and Lutkenhaus, 1998; Chen *et al.*, 2002; Buddelmeijer and Beckwith, 2004). Le domaine C-terminal est une ATPase de type RecA qui forme des hexamères et agit comme une machine de translocation de l'ADN nécessaire à la décaténation des chromosomes frères (Dubarry and Barre, 2010). En effet, FtsK stimule l'activité des recombinases XerC et XerD qui reconnaissent les sites dif (sites de recombinaison d'ADN) et séparent le dimère du chromosome dupliqué et leur répartition entre les cellules filles (Aussel *et al.*, 2002). Dans les essais de double hybride bactérien FtsK interagit avec FtsZ, FtsQ, FtsL et PBP3 (Di Lallo *et al.*, 2003; Karimova *et al.*, 2005; Grenga *et al.*, 2008; Dubarry and Barre, 2010).

2.3.2. FtsQLB

Les trois protéines essentielles FtsQ, L et B forment un sous-complexe (FtsQLB) qui a été largement caractérisé génétiquement et biochimiquement (Buddelmeijer and Beckwith, 2004). Cependant, le rôle de ces protéines dépourvues d'activité catalytique reste mal défini. Ce sous-complexe semble avoir notamment un rôle structurel au niveau du divisome, en réalisant de nombreuses interactions avec d'autres protéines du divisome dont FtsW, PBP3 et FtsN (Buddelmeijer and Beckwith, 2004; Karimova *et al.*, 2005). Des expériences de double-

hybride ont montré que FtsQ interagissait avec FtsA, FtsK, FtsX, FtsL, FtsB, FtsW, PBP3 et FtsN (Di Lallo *et al.*, 2003; Karimova *et al.*, 2005; D'Ulisse *et al.*, 2007). Néanmoins, de nouvelles études tendent à montrer que FtsQLB serait impliqué dans l'initiation de la division cellulaire par un mécanisme encore mal connu (Voir 2.3.5) (Liu *et al.*, 2015; Tsang and Bernhardt, 2015). FtsQ, L et B sont constituées d'un segment cytoplasmique, un segment transmembranaire ainsi que d'une large portion périplasmique. Bien que le sous-complexe soit recruté par FtsK, celui-ci se forme en absence de cette dernière (Buddelmeijer and Beckwith, 2004; Lutkenhaus *et al.*, 2012; Glas *et al.*, 2015). Des zones d'interactions entre les portions périplasmiques des trois protéines du sous-complexe FtsQLB ont pu être caractérisées précisément (Glas *et al.*, 2015) (Fig. I.29). De plus, les domaines transmembranaires de FtsB et FtsL sont également en interaction comme le suggèrent des résultats de FRET (**F**örster **r**esonance **e**nergy **t**ransfer) (Khadria and Senes, 2013). La stœchiométrie du complexe est encore mal connue et deux modèles 2 : 2 : 2 ou 1 : 1 : 1 ont pu être avancés sur base de différentes techniques de modélisation ou expérimentales (van den Ent *et al.*, 2008; Villanelo *et al.*, 2011; Glas *et al.*, 2015; Condon *et al.*, 2018).

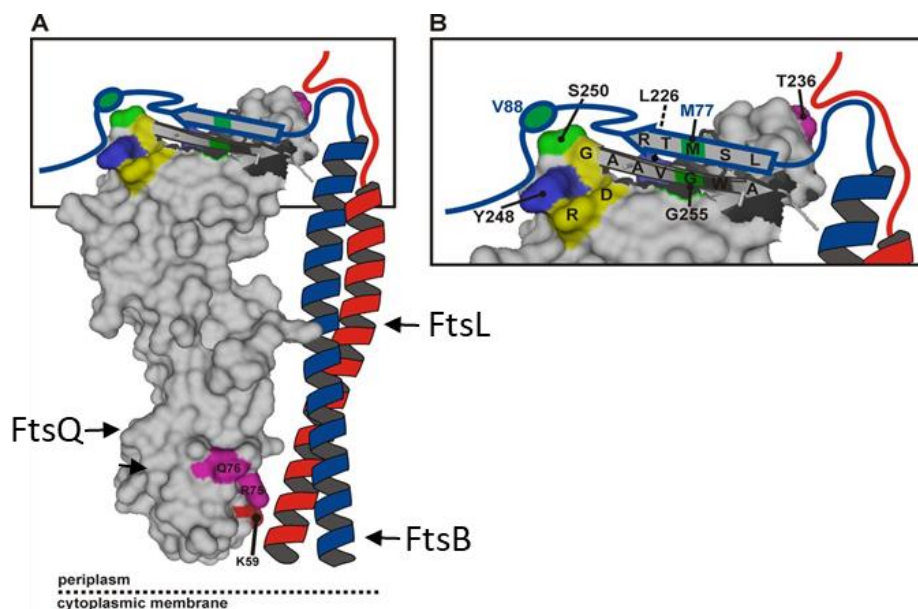


Figure I.29 : Modèle illustrant les interactions entre les régions périplasmiques de FtsB, FtsL et FtsQ au sein du sous-complexe FtsBLQ. A. FtsB et FtsL forment des hélices alpha en interactions entre elles et avec FtsQ B. Les régions C-terminales de FtsB et FtsL se situent à proximité du résidu Thr-236 de FtsQ. La région C-terminale de FtsB forme un feuillet β avec un brin β de FtsQ, alors que la région proche du résidu 88 de FtsB interagit avec une région de FtsQ composée par les résidus Leu-226, Tyr-248, et Ser-250. On retrouve (en jaune), entourant les interactions décrites auparavant, un motif hautement conservé entre séquences homologues de FtsQ : DLRY(d/e) (s/t) G. **Bleu** : FtsB ; **Rouge** : FtsL ; **Gris** : Structure de la portion périplasmique de FtsQ.

2.3.3. *FtsW*

FtsW est une protéine essentielle de la division de 45 kDas, composée de dix segments transmembranaires et d'une large boucle périplasmique caractéristique reliant les segments 7 et 8 (Fig. 1.30). FtsW appartient à la famille des protéines SEDS qui inclus RodA et SpoVE impliquées respectivement dans l'élongation chez *E. coli* et la sporulation chez *B. subtilis*

(Ishino *et al.*, 1989). Les protéines SEDS sont typiquement localisées dans le même opéron que leur PBP3 apparentées (PBP3 et FtsW, PBP2 et RodA et SpoVD et SpoVE). Malgré son rôle mal défini, des études fonctionnelles ont permis la mise en évidence des rôles des différentes portions de FtsW (Fig. I.30). Les 75 premiers résidus de FtsW sont suffisants pour interagir avec FtsQ (D'Ulisse *et al.*, 2007). La boucle périplasmique (P368-P375) entre les segments 9 et 10 interagit avec PBP3 et PBP1b, cette boucle pourrait donc jouer un rôle important dans le positionnement des enzymes de synthèse du peptidoglycane au sein du divisome (Fraipont *et al.*, 2011). La région amphiphile (E240-A249) au niveau de la grande boucle périplasmique 7/8, serait importante pour la fonction de la protéine. La portion amphiphile (R166-F178) au niveau de la boucle cytoplasmique 4/5 ainsi que le segment transmembranaire 8 semblent critiques pour assurer une bonne conformation de FtsW (Pastoret *et al.*, 2004). Par ailleurs, des études d'interaction ont montré que FtsW interagissait avec FtsL, PBP3, PBP1b, FtsN et FtsQ et que FtsW était nécessaire pour le recrutement de PBP3 au site de division. (Karimova *et al.*, 2005; Fraipont *et al.*, 2011).

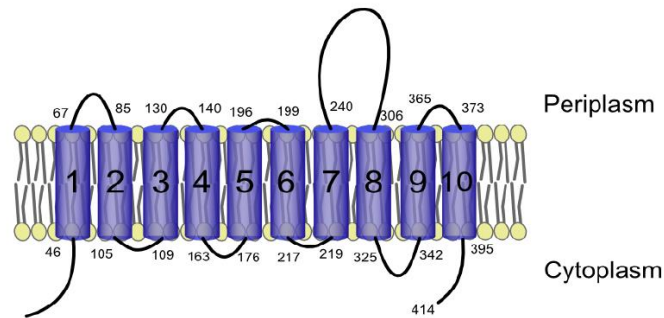


Figure I.30 : Topologie de FtsW (Lara and Ayala, 2002).

2.3.4. PBP3

PBP3 est une PBP de classe B essentielle de la division et interagit avec FtsA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsZ, FtsW, PBP1b et FtsN (Di Lallo *et al.*, 2003; Karimova *et al.*, 2005; D'Ulisse *et al.*, 2007; Fraipont *et al.*, 2011) (Fig. I.31). Les 70 premiers résidus du PBP3 sont suffisants pour interagir avec FtsW et FtsQ alors que les 250 premiers acides aminés sont nécessaires pour permettre l'interaction avec FtsL (Karimova *et al.*, 2005). Les résidus G57, S61, L62 et R210 de PBP3 sont cruciaux pour l'interaction avec FtsN (Wissel and Weiss, 2004). Les 56 premiers acides aminés de PBP3 sont suffisants pour le recrutement de PBP1b qui dépend de la présence du PBP3 mais pas de son activité (Bertsche *et al.*, 2006). Enfin, les 47 premiers acides aminés comprenant le segment transmembranaire de PBP3 possèdent les déterminants de structure suffisants pour la localisation de la protéine au site de division. En tant que PBP de classe B, PBP3 ne possède pas d'activité glycosyltransférase. Le fait que PBP1b interagisse avec PBP3 et se localise préférentiellement au site de division de manière PBP3-dépendante, suggère que PBP1b coopère avec PBP3 pour la synthèse du peptidoglycane septal. De plus, il a été montré que PBP3 interagit avec les protéines du divisome dont FtsN et FtsW (Bertsche

et al., 2006; Müller *et al.*, 2007). Enfin la structure cristallographique de la portion périplasmique de PBP3 de *E. coli* a pu être résolue (Sauvage *et al.*, 2014) (Fig. I.31).

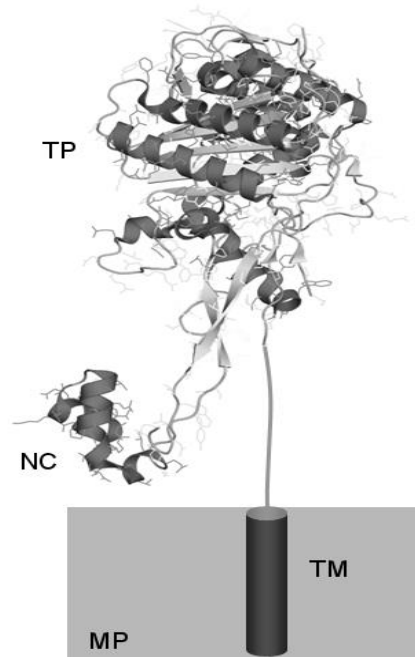


Figure I.31 : Modèle de la structure de PBP3. TP : domaine transpeptidase, NC : domaine non-catalytique, TM : segment transmembranaire, MP : membrane cytoplasmique (Derouaux *et al.*, 2013).

2.3.5. *FtsN*

Enfin, FtsN est la dernière protéine essentielle rejoignant le divisome. L'arrivée de FtsN est le signal que le divisome est complet et que la synthèse du peptidoglycane septal peut débuter (Gerding *et al.*, 2009; Lutkenhaus, 2009; Weiss, 2015). FtsN est une protéine bitopique composée d'une courte portion cytoplasmique N-terminale, d'un segment transmembranaire (acides aminés 34 à 53) et d'un large domaine périplasmique (Fig. I.32). Ce dernier comprend 3 hélices alpha (H1, H2 et H3), une région non structurée riche en glutamine (a.a. 124-242) et un domaine SPOR en C-terminal (Dai *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2004) (Fig. I.32). Le domaine SPOR est un domaine de liaison au peptidoglycane et plus spécifiquement aux chaînes de glycanes dépourvues de peptide (Gerding *et al.*, 2009; Yahashiri *et al.*, 2015). Le domaine N-terminal cytoplasmique de FtsN interagit avec FtsA (Busiek *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Pichoff *et al.*, 2015) (Fig. I.33). Au sein de l'hélice H2 se trouve le domaine essentiel E de FtsN responsable de l'activation de la synthèse du peptidoglycane septal. En effet, cette région à elle seule peut compléter la délétion de FtsN quand elle est surexprimée et exportée dans le périplasm. Cependant à un niveau physiologique la partie cytoplasmique ainsi que le domaine SPOR sont importants pour la localisation correcte du domaine E au septum (Busiek and Margolin, 2014; Pichoff *et al.*, 2015).

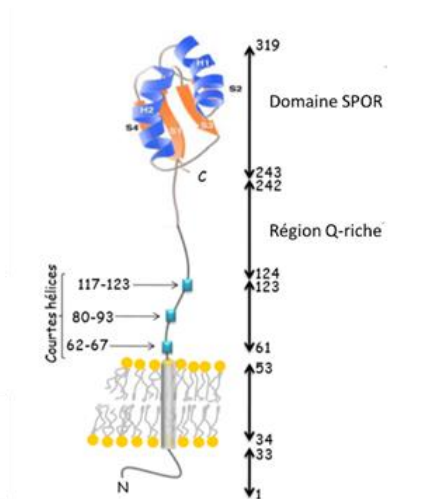


Figure I.32 : Structure de FtsN. Le domaine SPOR en C-terminal interagit avec le peptidoglycane, il est connecté, via un long segment riche en glutamine, à 3 courtes hélices qui sont ancrées dans la membrane par une hélice transmembranaire (Yang *et al.*, 2004).

Une multitude d'interactions entre FtsN et d'autres composants du divisome ont été mises en évidence dont celles avec FtsA, ZapA, FtsBLQ, FtsW, PBP3 et PBP1b (Di Lallo *et al.*, 2003; Karimova *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007; Alexeeva *et al.*, 2010; Busiek *et al.*, 2012). Différents rôles ont été attribués à FtsN comme le déclenchement de la phase de constriction cellulaire ou un rôle dans la stabilisation du divisome, l'absence de FtsN induisant un désassemblage du divisome (Gerding *et al.*, 2009; Möll and Thanbichler, 2009; Rico *et al.*, 2010). Le recrutement de FtsN au septum est complexe et nécessite la présence des protéines FtsA, FtsQ et PBP3 (Addinall *et al.*, 1997; Goehring *et al.*, 2007). Dans le modèle actuel le recrutement de FtsN est initié par l'interaction de FtsN avec un monomère de FtsA permettant une faible localisation et activation par le domaine E de la synthèse du peptidoglycane septal (Gerding *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). L'activation de la synthèse et la présence de FtsN conduit à l'activation des amidases qui vont cliver la partie peptidique du peptidoglycane et générer ainsi le substrat préférentiel du domaine SPOR de FtsN. Ainsi FtsN renforce son propre recrutement au site de division (Peters *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Busiek and Margolin, 2014; Yahashiri *et al.*, 2015). Il y a donc un mécanisme de retour positif impliquant FtsN, les amidases, FtsBLQ, PBP3/FtsW et PBP1b conduisant à l'amplification de la synthèse du peptidoglycane au niveau du site de division (Gerding *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Yahashiri *et al.*, 2015). Comment le domaine E active la synthèse du peptidoglycane reste mal connu. Cependant, de multiples résultats, notamment basés sur l'identification de mutants du domaine E ont fourni des preuves de l'implication de FtsQLB et FtsA dans la régulation de cette activation (Liu *et al.*, 2015; Tsang and Bernhardt, 2015) (Fig. I.33).

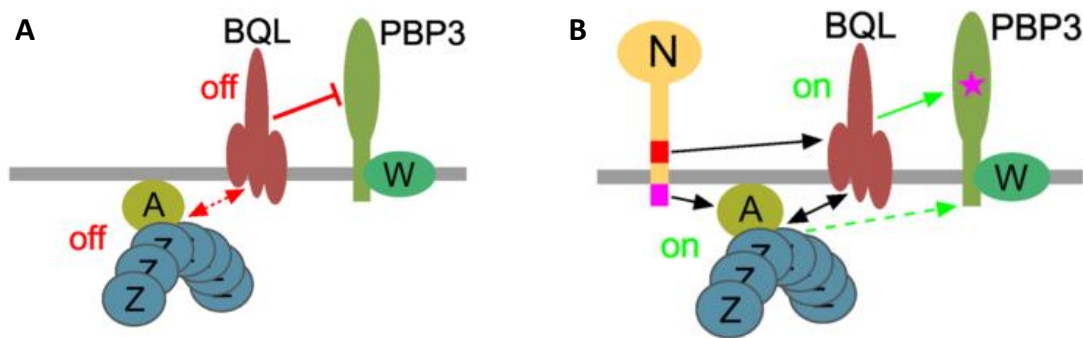


Figure I.33 : Modèle de la collaboration de FtsN, FtsBLQ et FtsA pour l'activation de la synthèse du peptidoglycane au site de division. A. La quantité de FtsN (N) au site de division est faible. Le complexe FtsBLQ (BLQ) est dans une conformation non active et ne peut activer la synthèse du peptidoglycane réalisée par FtsW-PBP3. FtsA (A), ancré au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique est également dans une conformation inactive. **B. FtsN s'accumule au site de division,** et le domaine E de FtsN (rectangle rouge), permet directement ou indirectement le passage de FtsBLQ dans sa conformation active pouvant stimuler la synthèse du peptidoglycane (étoile rose dans PBP3). La région N-terminale de FtsN (rectangle rose) interagit directement avec le domaine 1C de FtsA, permettant à FtsA de se retrouver dans sa conformation active. Dès lors, FtsBLQ et FtsA s'activent mutuellement via des interactions directes ou indirectes. La possibilité que FtsZ (Z) active la synthèse du peptidoglycane de manière FtsBLQ-indépendante n'est pas exclue.

Dans ce modèle, FtsQLB et FtsA sont recrutées au septum sous une forme inactive et l'arrivée de FtsN pousse le système en mode actif avec son domaine E qui agit dans le périplasma et son domaine N-terminal dans le cytoplasme. Donc au niveau du périplasma, dans un premier temps la concentration de FtsN est faible et FtsQLB existe principalement dans une conformation inactive qui réprime alors activement la synthèse du peptidoglycane septal par le complexe PBP3-FtsW et les enzymes associées (Fig. I.33A). Cette répression est probablement induite par des contacts physiques directs entre les deux sous-complexes (Liu *et al.*, 2015). Quand FtsN s'accumule au niveau du septum, le domaine E de FtsN induirait un changement de conformation de FtsQLB qui stimule l'activité de PBP3-FtsW et donc la synthèse du peptidoglycane au site de division (Fig. I.33B). Au niveau du cytoplasme, la partie N-terminale de FtsN interagit avec le domaine 1C de FtsA favorisant ainsi sa forme monomérique et active (Galli and Gerdes, 2012)(Fig. I.33B). En effet, FtsA s'assemble initialement au niveau de l'anneau-Z en formant des filaments dans lesquels le domaine 1C est occulté par les interactions FtsA-FtsA (Busiek and Margolin, 2014). Cependant, ZipA et FtsA étant en compétition pour le domaine CCTP de FtsZ, l'incorporation de ZipA libère du FtsA qui peut alors interagir, via son domaine 1C, avec FtsN (Pichoff *et al.*, 2012; Pichoff *et al.*, 2015). Le modèle suggère également qu'il existe un renforcement mutuel des deux formes actives de FtsA et du sous complexe FtsBLQ de manière FtsN-indépendante (Liu *et al.*, 2015).

2.4. Invagination de la membrane externe

La division chez les bactéries à Gram négatif implique la coordination de l'invagination de la membrane cytoplasmique et de la synthèse du peptidoglycane septal avec celle de la membrane externe. Cette tâche fait intervenir le système Tol-Pal dont la localisation au niveau

du site de constriction dépend de FtsN (Gerding *et al.*, 2007; Teleha *et al.*, 2013). Ce système est dépendant de la force protono-motrice et est bien conservé chez les bactéries à Gram négatif (Gerding, 2001; Sturgis, 2001). Il comprend cinq protéines réparties en deux complexes ; le premier ancré dans la membrane cytoplasmique, composé des protéines membranaires TolA, TolQ et TolR. Le second complexe se compose de la protéine périplasmique TolB et de la lipoprotéine Pal (Gerding *et al.*, 2007) (Fig. I.34A). Ce système permet de créer un lien entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe par l'intermédiaire de l'interaction entre la protéine Pal et l'extrémité C-terminale de TolA (Cascales *et al.*, 2000; Cascales and Llobès, 2004). De cette manière, le mouvement de constriction initié à la membrane cytoplasmique est répercuté à la membrane externe. Un lien entre la synthèse du peptidoglycane septal et la constriction est établi par le biais de la protéine CpoB (Typas *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2015). En effet, au moment de la constriction, la protéine CpoB forme un sous-complexe avec PBP1b-LpoB et TolA. Ces interactions physiques sont dynamiques et permettent une régulation directe de l'activité de PBP1b en réponse à l'assemblage du système Tol-Pal (Fig. I.34).

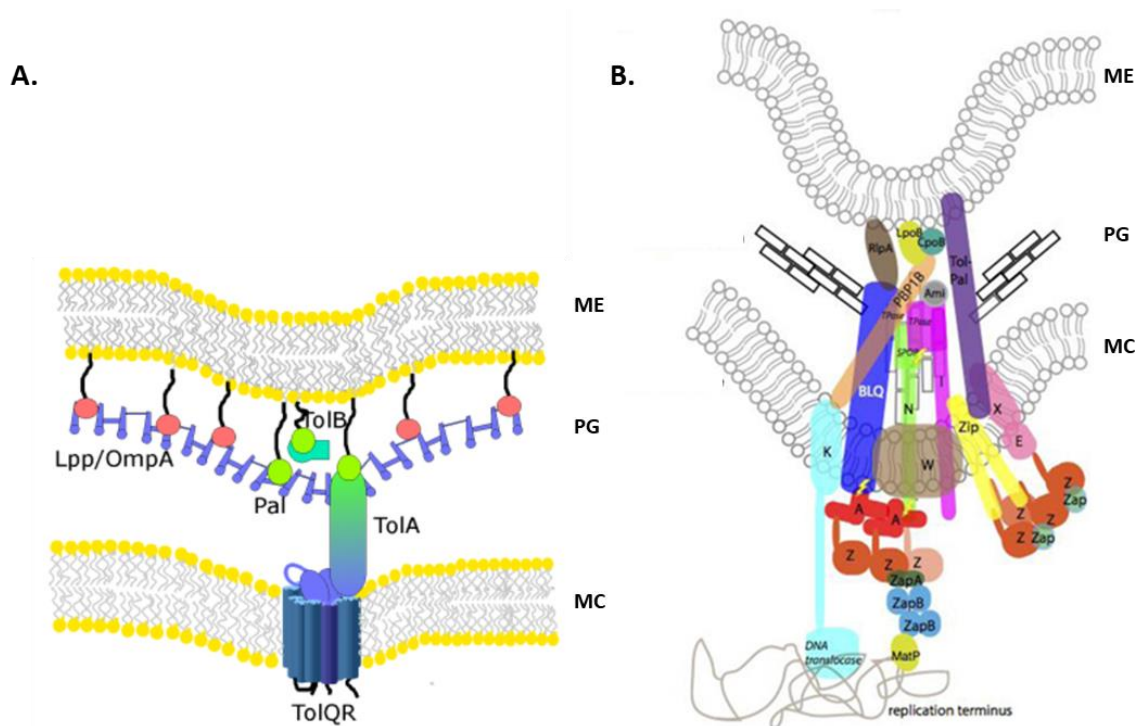
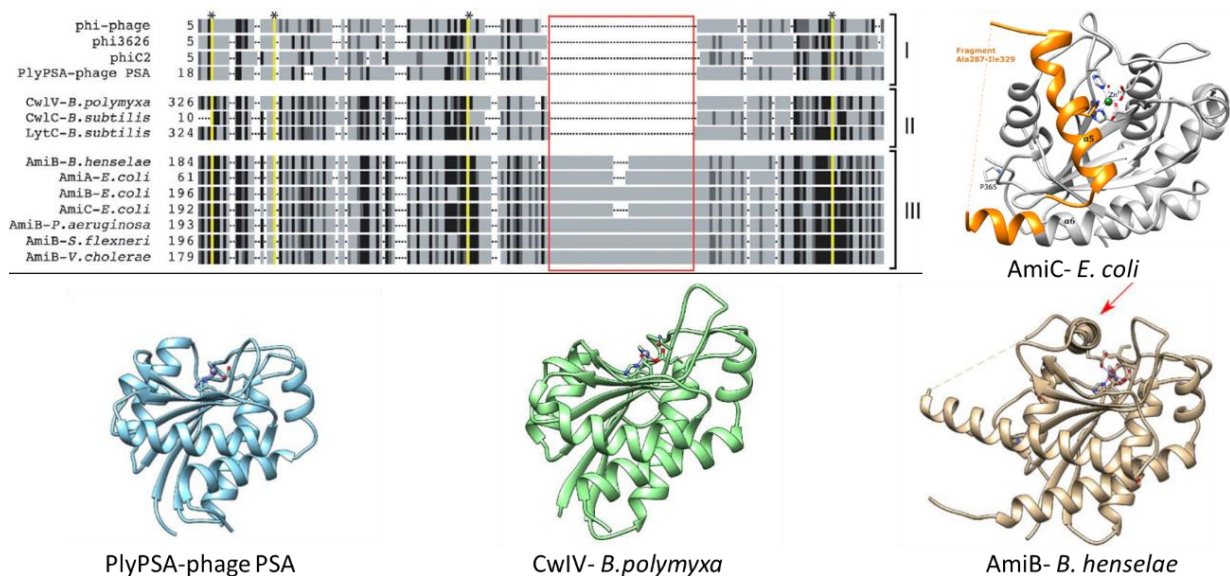


Figure I.34 : Complexe Tol-Pal et représentation du divisome lors de la constriction. A. Représentation schématique de l'invagination de la membrane externe par le complexe Tol-Pal. (Gerding *et al.*, 2007). **B. Représentation schématique du divisome lors de la constriction.** Les polymères de FtsZ sont ancrés au niveau de la membrane par FtsA et ZipA, avec d'autres protéines du divisome (essentielle et non essentielle) qui traversent la membrane interne, certaines entrant en contact avec le peptidoglycane et la membrane externe. Toutes les protéines Fts sont présentées sous la forme d'une seule lettre. La dynamique de FtsZ est représentée par le monomère FtsZ de couleur plus claire sortant du polymère. Les activités enzymatiques connues sont mises en italique. ZapC et ZapD sont désignés par "Zap", et les différentes amidases sont désignées par "Ami". Les liens entre le divisome et la région terminale du nucléoïde, y compris entre le domaine hélicase de FtsK et MatP, et entre MatP et ZapB sont représentés. Les régions potentielles de régulation sont montrées par des éclairs (Haeusser and Margolin, 2016). **ME** : membrane externe ; **PG** : peptidoglycane ; **MC** : membrane cytoplasmique.

2.5. Hydrolyse du peptidoglycane septal et séparation des cellules filles

2.5.1. *AmiA, AmiB et AmiC*

La synthèse du peptidoglycane septal est accompagnée ou immédiatement suivie par son hydrolyse, essentiellement par les *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidases périplasmiques (*AmiA*, *AmiB* et *AmiC*) (voir 1.1.4.1.4), afin de former les deux nouveaux pôles des cellules filles. Les amidases *AmiA*, *B* et *C* appartiennent à la famille des amidase_3, ce sont des métalloenzymes à zinc qui clivent le lien amide entre la première alanine du peptide et la chaîne de glycane. Ces enzymes sont auto-inhibées par une hélice α obstruant le site actif et nécessitent une activation (Fig. I.35).



Cette une activité d'hydrolyse incontrôlée a été observée dans le cas de mutation dans l'hélice α chez *AmiB* ainsi que pour la protéine *AmiC* dépourvue d'hélice α (Yang *et al.*, 2012; Rocaboy *et al.*, 2013). Ces observations indiquent que, contrairement aux autres amidases de la famille amidase_3, les amidases du divisome nécessitent des activateurs (Yang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Rocaboy *et al.*, 2013) (Fig. I.35). Les amidases *AmiA* et *AmiB* sont sous le contrôle d'EnvC alors qu'*AmiC* dépend de NlpD (Uehara *et al.*, 2009; Uehara *et al.*, 2010; Rocaboy *et al.*, 2013). La délétion simultanée des trois amidases conduit à un défaut sévère de la séparation cellulaire et la formation de chaînes de cellules (Heidrich *et al.*, 2001; Priyadarshini *et al.*, 2007) (Fig. I.36B et C). Néanmoins, ce phénotype n'est pas létal et peut être exacerbé par la perte de membres d'autres classes d'hydrolases du peptidoglycane comme les transglycosylases lytiques ou les DD-endopeptidases (Heidrich *et al.*, 2002; Priyadarshini *et al.*, 2006). Un phénotype moins sévère est observé pour les simples délétions *AmiA* et *AmiC* avec

respectivement 5% à 10% et 20 à 30% de cellules formant des chaînes. Cependant la simple délétion AmiB ne montre aucun problème de division (Heidrich *et al.*, 2001).

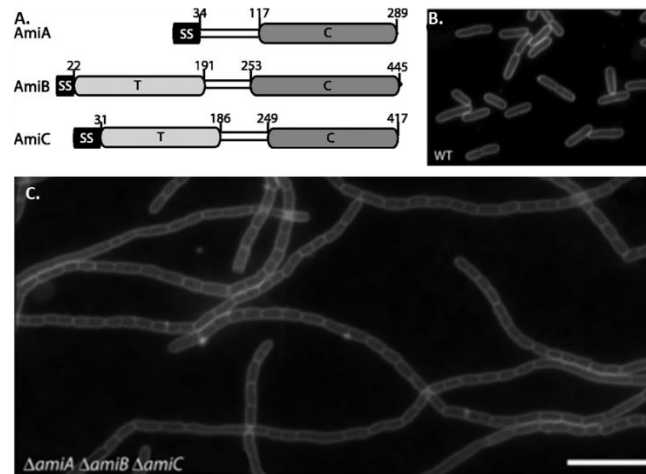


Figure I.36 : Amidases de la division cellulaire de *E. coli*. A. Représentation schématique d’AmiA, AmiB et AmiC. SS : séquence signal ; T : domaine AMIN ; C : domaine catalytique. B. Cellules sauvages *E. coli*. C. Triple mutant $\Delta amiA \Delta amiB \Delta amiC$. (Bernhardt and De Boer, 2003; Priyadarshini *et al.*, 2007)

AmiA et AmiC sont transportées dans le cytoplasme par le système Tat (twin-arginine translocation) alors que AmiB est transportée par la machinerie Sec. La localisation de AmiB et AmiC s’effectue par le biais de leur domaine AMIN, celui-ci étant suffisant pour la localisation des protéines au site de division mais leurs localisation dépend aussi de la présence de FtsN (Bernhardt and De Boer, 2003; Peters *et al.*, 2011)(Fig. I.36A). Le domaine AMIN est répandu chez les protéines périplasmiques des bactéries à Gram négatifs impliquées dans le métabolisme de la paroi cellulaire (de Souza *et al.*, 2008). AmiA étant dépourvu de domaine AMIN, celle-ci se localise de manière dispersée dans le périplasma (Fig. I.36A). La structure cristallographique de l’amidase AmiC montre le domaine AMIN en N-terminal séparé du domaine catalytique C-terminal par une région non structurée contenant une hélice- α (Fig. I. 36A). Le domaine AMIN est constitué de deux feuillets β reliés par une courte hélice α . On retrouve quatre motifs RxxxD/E ; deux sur chaque feuillet β . De plus, la superposition des deux feuillets β , fait apparaître des résidus conservés d’un feuillet à l’autre, les motifs RxxxD/E représentant plus de la moitié de ces résidus conservés (Fig. I.37B). La conservation et la position symétrique au niveau des deux feuillets de ces résidus suggèrent que le domaine AMIN pourrait avoir deux sites de liaison au peptidoglycane (Rocaboy *et al.*, 2013).

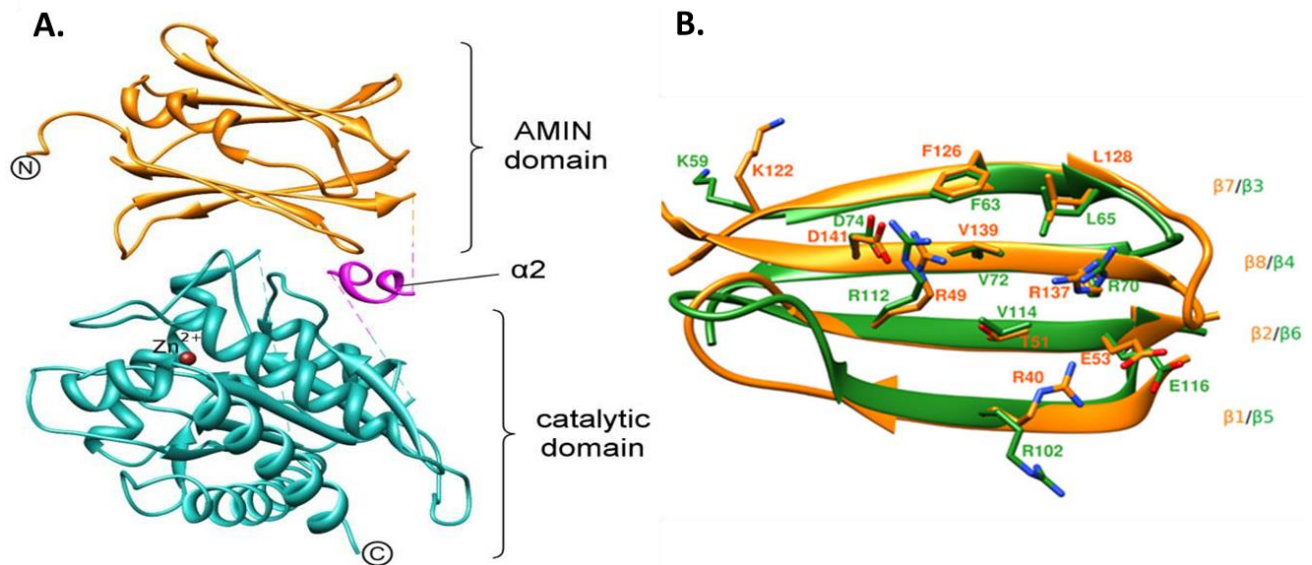


Figure I.37 : Structure d'AmiC. A. Structure cristallographique d'AmiC. B. Superposition des feuillets β du domaine AMIN faisant apparaître les résidus conservés d'un feuillet à l'autre (Rocaboy *et al.*, 2013).

2.5.2. Les facteurs LytM

Le membre fondateur de la famille des LytM est la lysostaphine. Cette protéine est une métallo-endopeptidase qui clive les ponts pentaglycines dans le peptidoglycane des staphylocoques (Firczuk and Bochtler, 2007). Depuis la description de la structure de LytM, des protéines appartenant à cette famille et provenant d'un éventail d'espèces bactériennes ont été identifiées comme étant impliquées dans divers processus importants comme la division cellulaire, l'élongation cellulaire ou encore la sporulation (Cohen *et al.*, 2009; Uehara *et al.*, 2009; Bonis *et al.*, 2010; Goley *et al.*, 2010; Poggio *et al.*, 2010; Sycuro *et al.*, 2010; Möll *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2012). Plusieurs protéines de type LytM ont été caractérisées structurellement et/ou biochimiquement et la majorité semblent également être des métallo-endopeptidases qui clivent la partie peptidique du peptidoglycane (Lu *et al.*, 2006; Cohen *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2012). *E. coli* code pour quatre protéines avec des domaines LytM ; EnvC, NlpD, YebA et YgeR (Fig. I.38A). EnvC et NlpD ont des fonctions importantes dans la séparation cellulaire comme le montre le phénotype en chaînette du double mutant et leurs localisations au site de division (Uehara *et al.*, 2009) (Fig. I.38B).

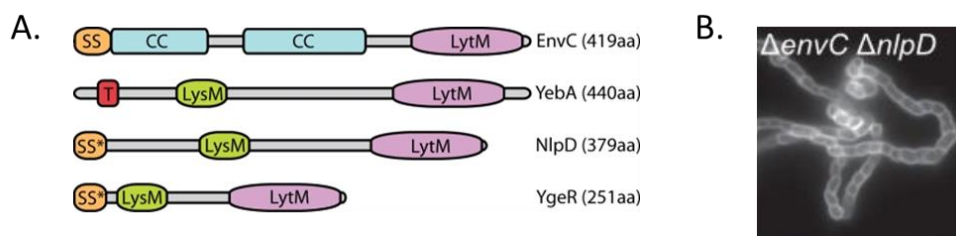


Figure I.38 : Facteurs LytM de *E. coli*. A. Topologie des quatre protéines portant un domaine LytM chez *E. coli*. LytM : domaine LytM ; LysM : domaine de liaison au peptidoglycane LysM ; CC : « coiled-coil » domaine ; T : domaine transmembranaire ; SS : séquence signal ; SS* : séquence signal de lipoprotéines. B. Double mutant $\Delta envC \Delta nlpD$ (Uehara *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011).

Cependant, EnvC et NlpD ne montrent pas d'activité d'hydrolyse du peptidoglycane *in vitro*. L'alignement des séquences de EnvC et NlpD avec celle de la lysostaphine montre que ces dernières ne possèdent pas les résidus conservés responsables de la liaison du Zn^{2+} dans le site actif (Uehara *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2013). La structure cristallographique de EnvC de *E. coli* confirme l'absence des résidus impliqués dans la chélation du zinc catalytique. Dans cette même étude, il a été démontré que les résidus se trouvant dans et autour du site actif dégénéré sont cruciaux pour la séparation cellulaire *in vivo* et pour activer l'amidase AmiB *in vitro* (Peters *et al.*, 2013). Ces résidus étant probablement directement impliqués dans l'interaction avec l'hélice inhibitrice des amidases de la division. Contrairement à NlpD, la présence au site de division d'EnvC ne dépend pas de la protéine FtsN. En effet, la localisation de la protéine EnvC dépend de son domaine « coiled-coil » et de la présence au septum du complexe FtsEX (Uehara *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011) (Fig. I.39A). Il a été démontré que le domaine « coiled-coil » de EnvC et la boucle externe du complexe FtsEX interagissaient directement (Yang *et al.*, 2011) (Fig. I.39A). En plus de sa fonction dans la localisation de EnvC, le domaine « coiled-coil » semble également être impliqué dans la régulation de la protéine (Uehara *et al.*, 2010). Effectivement, des études structurales de la protéine de division PcsB de *S. pneumoniae* indiquent que son domaine « coiled-coil » joue un rôle dans la régulation de l'activité hydrolase de cette protéine par un mécanisme d'auto-inhibition sous le contrôle de FtsEX (Bartual *et al.*, 2014). Des variants de FtsEX dépourvus d'activité ATPase recrutent encore EnvC au site de division mais ne parviennent pas à induire une hydrolyse du peptidoglycane septal (Uehara *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Cette observation a conduit à un modèle dans lequel l'activation de l'amidase par EnvC est stimulée par des changements conformationnels dans le complexe FtsEX induits par l'activité ATPase de FtsE (Yang *et al.*, 2011) (Fig. I.39A). Cette régulation permet de coordonner la constriction de l'anneau-Z avec l'hydrolyse du peptidoglycane (Du *et al.*, 2016) (Fig. I.39B).

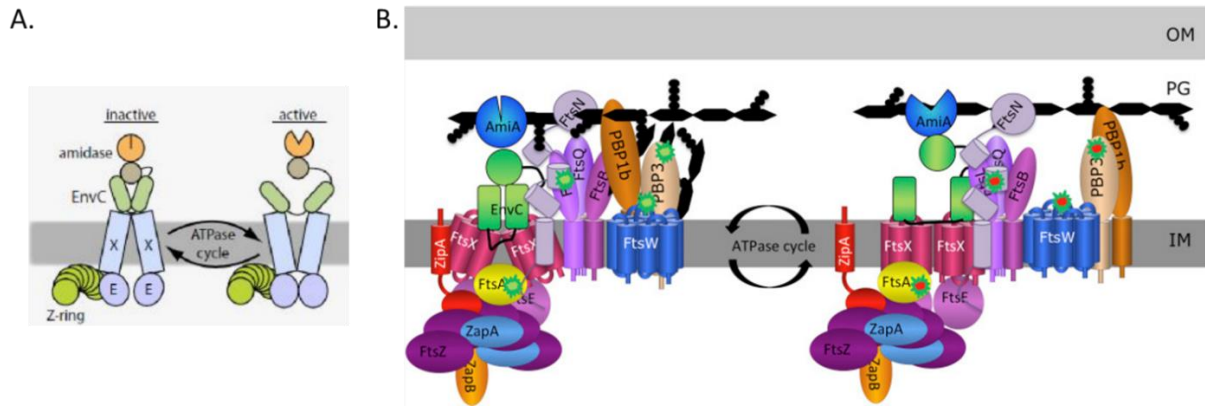


Figure I.39 : Activation des amidases par EnvC et FtsEX. **A.** Représentation schématique de l'activation des amidases par EnvC lui-même activé par l'hydrolyse de l'ATP par FtsEX. **B. Coordination de la synthèse et de l'hydrolyse du peptidoglycane.** Pendant l'assemblage du divisome, FtsEX se localise sur l'anneau-Z par une interaction entre FtsE et FtsZ. FtsEX active alors FtsA en empêchant sa polymérisation, conduisant au recrutement séquentiel des protéines tardives du divisome. La liaison de l'ATP et son hydrolyse n'est pas requise pour cette étape. Avant que FtsN arrive à l'anneau-Z, FtsQLB et FtsW-PBP3 sont dans un état inactif. Lorsque FtsN arrive à l'anneau-Z, il interagit avec FtsA dans le cytoplasme et le domaine E de FtsN, dans le périplasma, lève la répression de FtsQLBW pour commencer la synthèse de peptidoglycane. FtsEX hydrolyse l'ATP pour activer les amidases qui clivent le peptidoglycane septal nouvellement synthétisé. Après hydrolyse de l'ATP, FtsEX (sous forme ADP) bloque FtsA sous sa forme inactive ou empêche FtsA de communiquer avec d'autres protéines du divisome de sorte que la synthèse du peptidoglycane septal est bloquée. Des cycles répétés d'hydrolyse de l'ATP par FtsEX entraînent des cycles de synthèse et d'hydrolyse de la paroi cellulaire au niveau du septum. Les étoiles vertes représentent les protéines sous leurs formes inactives, les protéines activées sont indiquées par une étoile rouge (Du *et al.*, 2016; den Blaauwen *et al.*, 2017).

NlpD est une lipoprotéine contenant en plus du domaine LytM un domaine LysM de liaison au peptidoglycane nécessaire pour la localisation de la protéine au site de division (Buist *et al.*, 2008) (Fig. I.38A, Fig. I.20). Comme pour EnvC, NlpD semble activer son amidase associée, AmiC, par l'intermédiaire de son domaine LytM (Rocaboy *et al.*, 2013). Néanmoins, bien que le domaine LytM soit suffisant pour l'activation de l'amidase, il est incapable de conduire à une séparation cellulaire correcte, ce qui suggère que les autres domaines de la protéine sont nécessaires pour sa fonction *in vivo* (Uehara *et al.*, 2010; Tsang *et al.*, 2017). De récents résultats montrent que la régulation de NlpD dépendrait de la distance qui sépare NlpD de son amidase. NlpD étant associé à la membrane externe, il ne pourrait activer AmiC que lors de l'invagination de cette dernière (Tsang *et al.*, 2017). Dans ce modèle, l'action de NlpD sur le remodelage du peptidoglycane au site de division est coordonnée en partie avec l'invagination de la membrane externe (Fig. I.40).

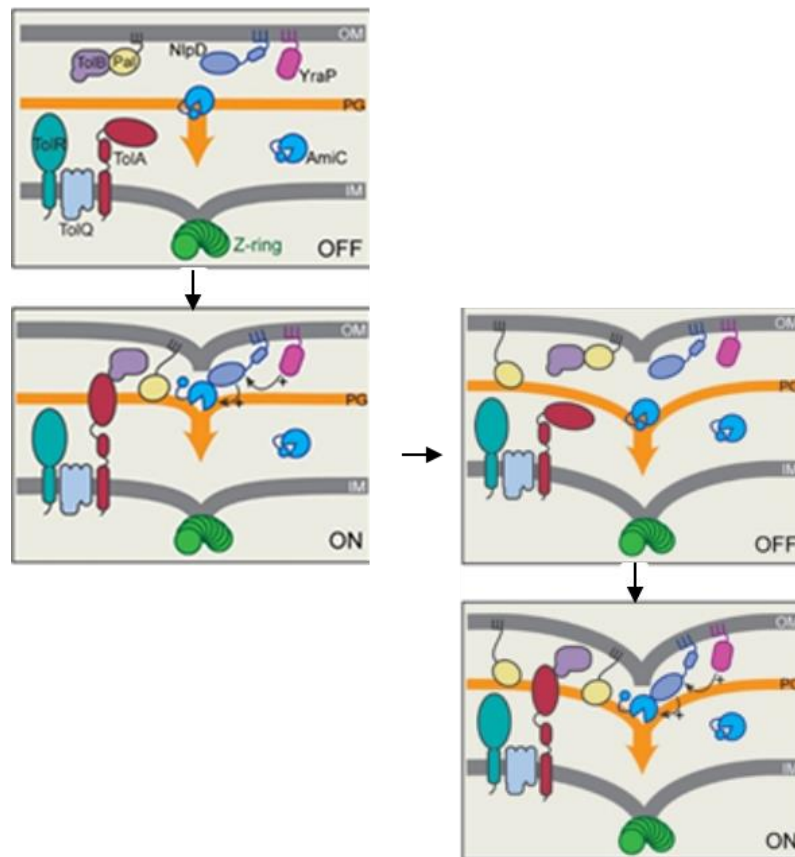


Figure I.40 : Modèle de la régulation de NlpD pendant la division cellulaire. Deux cycles du mécanisme potentiel coordonnant l'hydrolyse du peptidoglycane septal par NlpD/AmiC avec invagination de la membrane externe (OM). Avant l'initiation de la constriction, le domaine LytM de NlpD ancré dans la membrane externe ne peut accéder à la couche de peptidoglycane et/ou AmiC, potentiellement par des contraintes de distance physique ou de conformation de protéine. Lorsque le divisome est activé, la constriction de la membrane externe initiée par le système Tol-Pal amène le domaine LytM de NlpD à proximité de la couche de peptidoglycane et d'AmiC. Le traitement du peptidoglycane par AmiC devrait augmenter la distance entre la membrane externe et le peptidoglycane, rendant ainsi NlpD à sa configuration inactive et nécessitant un autre cycle de constriction et ainsi de suite jusqu'à ce que la division cellulaire soit terminée et les cellules filles séparées. (Tsang *et al.*, 2017)

En conclusion, la séparation des deux cellules filles par l'hydrolyse du peptidoglycane septal est parfaitement coordonnée aux autres processus de division. En effet, EnvC permet de coordonner l'hydrolyse du peptidoglycane septal avec la synthèse du peptidoglycane tandis que NlpD permet de coordonner l'invagination de la membrane externe respectivement (Du *et al.*, 2016; Tsang *et al.*, 2017) .

II. Objectifs

La formation d'un septum de peptidoglycane par les PBPs et le clivage de ce dernier par les amidases pour séparer les deux cellules filles sont deux étapes importantes de la division cellulaire bactérienne. Dans ce travail nous avons étudié : les interactions entre les protéines directement impliquées dans la synthèse du septum et l'effet de ces interactions sur celle-ci ainsi que le mécanisme d'interaction avec le PG de l'amidase AmiC par l'intermédiaire de son domaine AMIN. Ces processus étant des cibles potentielles pour le développement de nouveaux agents antibactériens.

Les enzymes directement responsables de la synthèse du peptidoglycane septal sont la PBP3 et la PBP1b. La synthèse serait coordonnée avec l'activité de FtsW ainsi que régulée par FtsN et d'autres protéines. FtsN joue également un rôle dans le maintien, la stabilité du divisome. Ces quatre protéines interagissent entre elles mais on ne connaît pas les mécanismes moléculaires régulant leur fonctionnement. Une partie de ce travail consistait à comprendre l'effet de ses interactions protéine-protéine sur l'activité et la régulation de la synthèse du peptidoglycane. Pour ce faire, nous avons isolé différents complexes de ces protéines et testé l'activité de synthèse du peptidoglycane *in vitro* en présence de ces complexes et de chacune des protéines. Nous avons aussi étudié l'interaction entre le lipide II et la protéine FtsW.

Le septum ainsi formé divise la cellule et doit être clivé pour permettre la séparation des cellules filles et la maturation des nouveaux pôles cellulaires. Les amidases AmiA, B et C sont responsables de la scission et la répartition du septum entre les deux nouveaux pôles des cellules filles. Ces enzymes sont activées de manière spécifique par des protéines caractérisées par la présence d'un domaine LytM (EnvC et NlpD), également recrutées au site de division. Ainsi AmiA et AmiB sont activées par EnvC, et AmiC par NlpD. AmiC est composée d'un domaine catalytique et d'un domaine AMIN qui lie le peptidoglycane et est nécessaire et suffisant pour la localisation de la protéine au site de division. NlpD contient un domaine LytM responsable de l'activation d'AmiC. La structure cristallographique d'AmiC est connue, mais le mode d'interaction du domaine AMIN avec le peptidoglycane pour la localisation au site de division et le mécanisme exact d'activation de l'amidase sont encore mal compris. La seconde partie de ce travail a donc consisté en l'étude du mécanisme d'interaction de l'amidase AmiC avec le PG via son domaine AMIN et l'étude de la régulation de l'amidase AmiC par le domaine LytM de NlpD. Dans ce but, nous avons réalisé des expériences d'interaction par RMN entre le domaine AMIN et le peptidoglycane ainsi que de la mutagenèse dirigée sur les résidus du domaine AMIN potentiellement impliqués dans la liaison au peptidoglycane. Enfin nous avons étudié le domaine LytM de NlpD par cristallographie.

III. Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Souches bactériennes

Souches	Génotype	Caractéristiques et utilisation
<i>E. coli</i> Mach1	$\Delta recA1398\ endA1\ tonA$ $\Phi 80\Delta lacM15\ \Delta lacX74\ hsdR$ (r_K^- K^+)	Souche utilisée pour l'amplification des plasmides. Cette souche est dépourvue de recombinaison ($recA^-$) et d'endonucléase ($endA^-$), permettant une amplification optimale de l'ADN plasmidique.
<i>E. coli</i> C43 (DE3)	F- $ompT\ gal\ dcm\ hsdSB$ (rB^- mB^-) (DE3)	Souche sélectionnée pour sa capacité à surexprimer des protéines membranaires en synthétisant davantage de lipides qui forment alors un réseau intracellulaire complexe de membranes. Tout comme la souche parentale BL21(DE3), elle porte le lysogène lambda DE3 codant pour l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. La mutation <i>ompT</i> inactive la protéase VII de la membrane externe, réduisant la protéolyse des protéines exprimées (Miroux and Walker, 1996; Wagner <i>et al.</i> , 2008).
<i>E. coli</i> MC1061	F- $\Delta(ara-leu)7697$ [<i>araD139</i>] B/r $\Delta(codB-lacI)3\ galK16$ $galE15\ \lambda^- e14^- mcrA0\ relA1$ $rpsL150(strR)\ spoT1\ mcrB1$ $hsdR2(r-m^+)$	Cette souche est utilisée pour la purification de peptidoglycane.
<i>E. coli</i> Lemo21 (DE3)	$fhuA2$ [<i>lon</i>] $ompT\ gal$ (λ DE3) [<i>dcm</i>] $\Delta hsdS$ /pLemo (CamR)	Cette souche permet un meilleur contrôle de l'expression basale et la production de protéines toxiques. Elle dérive de BL21(DE3) et contient le plasmide pLemo permettant l'expression du lysozyme Y, un inhibiteur de l'ARN polymérase du phage T7, sous le contrôle du promoteur p_{rhaBAD} inductible au rhamnose (Sigma-Aldrich). Le plasmide pLemo confère une résistance au chloramphénicol.
<i>E. coli</i> LMG 194	F- $\Delta lacX74\ galE\ thi\ rpsL$ $\Delta phoA$ (Pvu II) $\Delta ara714$ $leu::Tn10$	Cette souche dépourvue des gènes <i>araBAD</i> est résistante à la streptomycine et à la tétracycline. Elle est utilisée pour exprimer les plasmides de type pBAD. Une croissance en milieu minimum RM additionné de glucose permet de mieux contrôler l'expression basale du P_{BAD} .

Tableau III.1 : Tableau des souches utilisées au cours de ce travail.

1.2. Plasmides

Les vecteurs **pETDuet-1** et **pACYCDuet-1** (Novagen®) sont des vecteurs conçus pour la co-expression de deux gènes d'intérêt. On y retrouve deux sites de clonage multiple (MCS), tous deux précédés d'un promoteur T7, d'un opérateur *Lac* et d'un site RBS (Ribosome Binding Site). Ces deux plasmides portent respectivement un gène de résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol. Ils sont utilisés dans le cadre de la co-expression de complexes de protéines membranaires.

Le **pJET 1.2/blunt** (Thermo Scientific) : a été utilisé lors de la mutagenèse dirigée lorsqu'il y avait trop d'hybridation non-spécifiques.

Le **pET28-MHL** (Invitrogen, Carlsbad, Californie, États-Unis) a été utilisé pour la surexpression des protéines AmiC, le domaine AMIN, les mutants du domaine AMIN ainsi que le domaine LytM. Ce vecteur a la particularité de présenter un site de clivage par la protéase la TEV (Tobacco Etch Virus), permettant de retirer l'étiquette poly-histidine de la protéine.

Le **pBAD** (Guzman *et al.*, 1995) (Invitrogen) a été utilisé pour les tests de localisation *in vivo* du domaine AMIN et de ses mutants.

Les cartes plasmidiques se retrouvent en annexe A, ci-dessous le tableau reprenant les constructions utilisées lors de ce travail.

<i>Plasmides</i>	<i>Constructions</i>
<i>pDML2400</i>	pET28a, His-ftsW
<i>pDML2040</i>	pETDuet, His-ftsI, ftsW
<i>pDML2041</i>	pETDuet, His-ftsW, ftsI
<i>pDML2043</i>	pETDuet, His-ftsI, ftsW (293HA)
<i>pDML2045</i>	pACYCDuet, ponB, ftsN-S. tag
<i>pCIP1000</i>	pETDuet, His-ftsW, ponB
<i>pCIP1083</i>	pETDuet, His-ftsW _{HA} , ponB
<i>pET28MHL-WSe</i>	pET28MHL, His-ftsWSe
<i>pET28MHL-WKp</i>	pET28MHL, His-ftsWKp
<i>pCIP1051</i>	pETDuet, His-murJ
<i>AmiC PS-</i>	pET28MHL, His-amiC (30-417)
<i>AMIN PS-(AmiC)</i>	pET28MHL, His-amin (30-145)
<i>LytM (NlpD)</i>	pET28MHL, His-LytM (277-372)
<i>(AMIN)-sfGFP</i>	pBAD, PS-(AMIN)-sfGFP

Tableau III.2 : Tableau reprenant les constructions utilisées dans ce travail.

1.3. Oligonucléotides

Les oligonucléotides sont fournis par Eurogentec (Seraing, Belgique). L'annexe B reprend les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

1.4. Milieux

La composition des milieux est donnée par litre d'eau distillée.

Le milieu **LB** (**L**uria-**B**ertani) se compose de 10 g de bactotryptone (Difco) ; 5 g d'extrait de levure (Difco) et 10 g de NaCl. Ce milieu est communément utilisé pour les cultures d'*E. coli*.

Le milieu **solide LB** gélosé a la même composition que le milieu liquide et 15-20 g d'agar sont ajoutés par litre de milieu.

Le milieu **SOC** (**S**uper **O**ptimal broth with **C**atabolite repression) se compose de 20 g de bactotryptone ; 5 g d'extrait de levure ; 0,6 g de NaCl ; 1,9 g de KCl ; 2 g de MgCl₂ ; 2,5 g de MgSO₄ et 4 g de glucose. Il est idéal pour la croissance des cellules bactériennes après le choc thermique lors de leur transformation.

Le milieu **TB** (**T**errific **B**roth) se compose de 12 g de bactotryptone et de 24 g d'extrait de levure dissous dans de l'eau distillée pour arriver à un volume de 890 mL. Lequel est complété par 10 mL de glycérol 40 % et 100 mL de tampon phosphate (17 mM KH₂PO₄ et 95 mM K₂HPO₄). Ce milieu de culture est un milieu dit riche, utilisé pour favoriser une biomasse élevée des cultures d'*E. coli*.

Milieu **M9** (milieu minimum) se compose de 17,5 g de Na₂HPO₄ ; 5,5 g de KH₂PO₄ ; 1 g de NaCl ; 1 g de NH₄Cl ; 3 à 10 g de glucose ; 0,1mM de CaCl₂ et 1mM de MgSO₄. Ce milieu est utilisé pour marquer au ¹³C et ¹⁵N les protéines analysées par RMN.

Le milieu **RM** (milieu minimum) se compose de 6 g de Na₂HPO₄ ; 3 g de KH₂PO₄ ; 0,5 g de NaCl ; 1 g NH₄Cl ; 2 % de Casamino Acids ; 0,2 % de glucose et 1 mM de MgCl₂. Ce milieu a été utilisé pour produire le domaine AMIN couplé à la sfGFP.

1.5. Antibiotiques

Différents antibiotiques ont été utilisés pour sélectionner les bactéries transformées par les plasmides cités ci-dessus et maintenir ces plasmides dans les cellules lors des cultures.

L'**ampicilline** (MP Biomedicals, Eschwege, Allemagne) est un antibiotique du groupe des pénicillines qui inhibent des enzymes impliquées dans les étapes finales de synthèse du peptidoglycane. Elle est utilisée à une concentration finale de 100 µg/mL.

Le **chloramphénicol** (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) est un antibiotique qui interfère avec la synthèse des protéines en ciblant la sous-unité ribosomique 50S. Elle est utilisée à une concentration finale de 34 µg/mL.

La **flavomycine** (Hoechst, Frankfurt, Allemagne) est un antibiotique utilisé pour inhiber la réaction de transglycolysation.

La **kanamycine** (MP Biomedicals) est un aminoglycoside qui interfère avec l'activité ribosomique en ciblant la sous unité 30S. Elle est utilisée à une concentration finale de 50 µg/mL.

1.6. Détergents

DDM (n-dodécyl-β-D-maltopyranoside) (Inalco, Milano, Italie) : détergent utilisé pour la solubilisation et la purification de protéines membranaires. Il a une CMC (concentration micellaire critique) de 0,17 mM et forme des micelles dont la taille est comprise entre 70 et 100 kDa (Vanaken *et al.*, 1986).

LMNG (Lauryl Maltose Néopentyl Glycol) (Anatrace, Etats unis) : détergent utilisé pour la solubilisation des protéines membranaires. Il a une CMC de 0.01mM et forme des micelles d'environ 390 kDa (Chaptal *et al.*, 2017).

Polyéthylène glycol décyl éther : détergent non ionique utilisé dans les réactions de transglycoylation *in vitro* nécessitant une solubilisation du lipide II.

SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium) (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Allemagne) : détergent anionique communément utilisé pour la dénaturation des protéines lors des électrophorèses sur gel de polyacrylamide. Le SDS donne une charge négative à la protéine, proportionnelle à sa masse et se lie aux protéines selon un ratio approximativement constant d'une molécule de SDS pour 2 acides aminés. Il a une CMC de 6 à 8 mM.

1.7. Réactifs

Le **dansyle-lipide II** et le **NBD-lipide II** ont été préparés et fournis par Eefjan Breukink (université d'Utrecht, Pays-bas) (Fig. III.1A et B). Ceux-ci, ainsi que le [¹⁴C]-lipide II (0.155 µCi. nmol⁻¹) ont été préparés comme décrit par Terrak *et al.*, 1999 et Breukink *et al.*, 2003 (Fig. III.1C).

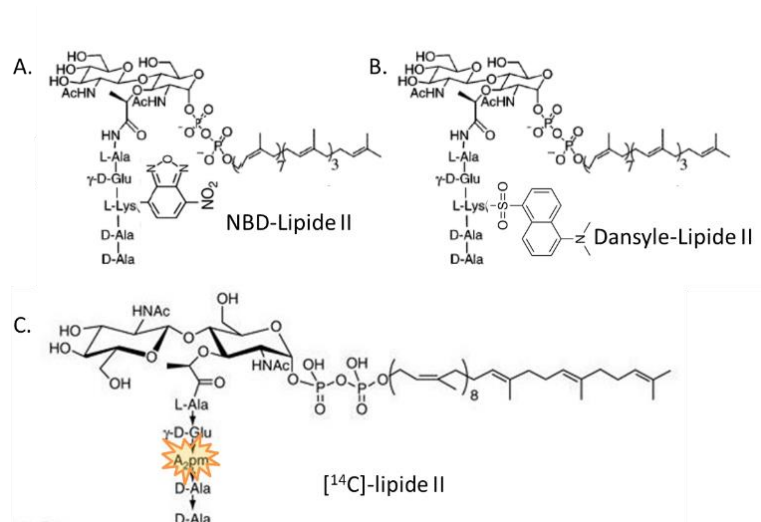


Figure III.1 : Représentation de la structure des variantes du lipide II utilisées. A. NBD-lipide II. Le nitrobenzoxadiazole est fixé au niveau du troisième acide aminé de la chaîne peptidique du lipide II **B.** Dansyle-lipide II. Le dansyle est fixé au niveau du troisième acide aminé de la chaîne peptidique du lipide II **C.** Le [¹⁴C] -lipide II. Le lipide II est marqué au ¹⁴C au niveau de l'acide diaminopimélique en position 3 de la chaîne peptidique du lipide II.

L'**ampicilline marquée** à la fluorescéine a été préparée comme décrit par Lakaye *et al.*, 1994

Le **chlorure d'ammonium** marqué (¹⁵N) ainsi que le **D-Glucose** marqué (**U-¹³C₆**) sont commandés chez Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL), Massachusetts, Etats Unis.

1.8. Enzymes

Les **Polymérases** : PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, Massachusetts, États-Unis)

Les **Enzymes de restriction** utilisées au cours de ce travail proviennent soit de chez Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, États-Unis) soit de chez New England Biolabs (NEB). Toutes les enzymes sont utilisées avec le tampon FastDigest Green Buffer ou le tampon FastDigest Buffer classique (Thermo Scientific).

La **Benzonase** est une endonucléase capable de dégrader l'ADN et l'ARN, elle est commandée chez NEB.

La **T4 DNA ligase** est fournie par NEB.

La **TEV** est le domaine catalytique de la protéine Nuclear Inclusion a (NIa) issue du Tobacco Etch Virus. Elle permet de cliver l'étiquette histidine des protéines en reconnaissant la séquence Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly. Elle est produite au sein de notre laboratoire avec une étiquette histidine et conservée à -80°C dans 50% de glycérol.

L'**α-Amylase** est une endohydrolase qui dégrade spécifiquement les liaisons α -1,4 glycosidiques. Elle est utilisée dans ce travail pour purifier le peptidoglycane. Elle est fournie par Boehringer (Ingelheim am Rhein, Allemagne).

La **Pronase** est une préparation commerciale consistant en un mélange de protéases extracellulaires produites par *Streptomyces griseus*. Elle est utilisée pour purifier le peptidoglycane et fournie par Boehringer.

La **Trypsine** est une endoprotéase qui clive les chaînes polypeptidiques après les acides aminés lysine et arginine. Elle est commandée chez Sigma-Aldrich et utilisée dans la purification du peptidoglycane.

1.9. Solutions et tampons

<u>Nom</u>	<u>Utilisation</u>	<u>Composition</u>
Purification des protéines FtsW, PBP3 et du complexe FtsW-PBP3		
Tampon de lyse	Tampon utilisé lors de la lyse des cellules.	- Tris-HCl 50 mM - NaCl 50 mM - MgCl ₂ 2,5 mM - Inhibiteurs de protéases (1 pastille par 50 mL) « complete, EDTA-free » (Roche, Mannheim, Allemagne) pH 8
Tampon de lavage	Tampon dans lequel les membranes sont lavées avant l'extraction.	- Tris-HCl 20 mM - NaCl 500 mM - Glycérol 10% (V/V) - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 8
Tampon d' extraction	Tampon permettant l'extraction des protéines des membranes bactériennes.	- HEPES 50 mM - NaCl 500 mM - Glycérol 10% (V/V) - DDM 2% (W/V) - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 7.5
Tampon A	Tampon dans lequel la colonne de nickel est équilibrée. Il est aussi utilisé pour laver la colonne après le chargement de la protéine et lors du dessalage.	- HEPES 50 mM - NaCl 300 mM - Glycérol 10% (V/V) - DDM 0,05% (W/V) pH 7.5
Tampon B	Tampon d'élution des protéines portant une étiquette poly-histidine.	- HEPES 50 mM - NaCl 300 mM - Glycérol 10%(V/V) - DDM 0,05% (W/V) - Imidazole 1 M pH 7.5

Purification du complexe FtsW-PBP1b et FtsW-PBP3-PBP1b		
Tampon d'extraction	Tampon permettant l'extraction des protéines des membranes bactériennes.	- HEPES 50 mM - NaCl 500 mM - Glycérol 10% (V/V) - LMNG 1% (W/V) - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 7.5
Tampon C	Tampon dans lequel la colonne chargée en nickel est équilibrée. Il est aussi utilisé pour laver la colonne après le chargement de la protéine et lors du dessalage.	- HEPES 50 mM - NaCl 200 mM - Glycérol 10% (V/V) - LMNG 0,02% (W/V) pH 7.5
Tampon D	Tampon d'élution des protéines portant une étiquette poly-histidine.	- HEPES 50 mM - NaCl 200 mM - Glycérol 10% (V/V) - LMNG 0,02% (W/V) - Imidazole 1M pH 7.5
Purification FtsW de <i>Klebsiella pneumoniae</i> et de <i>Salmonella enterica</i>		
Tampon de lyse	Tampon utilisé lors de la lyse des cellules.	- Tris-HCl 50 mM - NaCl 500 mM - Glycérol 5% (V/V) - MgCl 2,5 mM - β -mercaptoéthanol 2 mM - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 7.5
Tampon d'extraction	Tampon permettant l'extraction des protéines des membranes bactériennes.	- Sodium Phosphate 25 mM, - NaCl 500mM, - Glycerol 5% (V/V) - β -mercaptoéthanol 2 mM - DDM 2% - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 7
Tampon E	Tampon dans lequel la colonne d'affinité est équilibrée. Il est aussi utilisé pour laver la colonne après le chargement de la protéine et lors de dessalage.	- Sodium Phosphate 25 mM, - NaCl 500mM, - Glycerol 5% (V/V) - β -mercaptoéthanol 2 mM - DDM 0,05% pH 7

Tampon F	Tampon d'éluion des protéines portant une étiquette poly-histidine.	-Sodium Phosphate 25 mM, -NaCl 500mM, -Glycerol 5% (V/V) -β-mercaptoéthanol 2 mM -DDM 0,05% -Imidazole 1M pH 7
<u>Purification d'AmiC, du domaine AMIN et des mutants du domaine AMIN</u>		
Tampon de lyse	Tampon utilisé lors de la lyse des cellules.	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 300 mM - MgCl ₂ 2,5 mM - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 7.5
Tampon G	Tampon dans lequel la colonne d'affinité est équilibrée. Il est aussi utilisé pour laver la colonne après le chargement de la protéine et lors du dessalage	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 300 mM pH 7.5
Tampon H	Tampon d'éluion des protéines portant une étiquette poly-histidine.	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 300 mM - Imidazole 500 mM pH 7.5
Tampon de liaison	Tampon utilisé lors des tests de liaison au peptidoglycane	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 50 mM - MgCl ₂ 10 mM pH 6.8
Tampon RMN	Tampon utilisé pour les tests RMN de liaison du domaine AMIN avec le peptidoglycane	- Phosphate 20mM - NaCl 50mM - MgCl ₂ 10mM - EDTA 1mM - NaN ₃ 0,01 % pH 6.8
<u>Purification du domaine LytM de NlpD</u>		
Tampon de lyse	Tampon utilisé lors de la lyse des cellules.	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 100 mM - MgCl ₂ 2,5 mM - Inhibiteurs de protéases « complete, EDTA-free » pH 7.5
Tampon I	Tampon dans lequel la colonne d'affinité est équilibrée. Il est aussi utilisé pour laver la	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 100 mM

	colonne après le chargement de la protéine et lors de dessalage.	pH 7.5
Tampon J	Tampon d'éluion des protéines portant une étiquette poly-histidine.	- Tris-HCl 30 mM - NaCl 100 mM - Imidazole 500 mM pH 7.5
<u>Electrophorèse SDS-PAGE.</u>		
Tampon TGS	Tampon de migration pour les gels de polyacrylamide, en présence de SDS.	- <u>T</u> ris-HCl 25 mM - <u>G</u> lycine 192 mM - <u>S</u> DS 0,1% (W/V) pH 8,3
Bleu dénaturant 5x	Solution permettant la coloration, la dénaturation et le chargement des échantillons de protéines sur gels. Il doit être dilué 5 fois dans l'échantillon.	- Tris-HCl 30 mM pH 6,8 - Glycérol 25% (V/V) - SDS 2% (W/V) - bleu de bromophénol 0,1% (W/V) - β-mercaptoéthanol 5% (V/V)
<u>Analyse SDS-PAGE des chaînes de glycanes en tampon Tris-Tricine.</u>		
Tampon à l'anode	Tampon contenu dans la chambre du bas de la cuve d'électrophorèse.	- Tris-HCl 0,1 M pH 8
Tampon à la cathode	Tampon du haut de la cuve d'électrophorèse.	- Tris-HCl 0,1 M - Tricine 0,1 M - SDS 0,1% (W/V) pH 8.25
Tampon K	Tampon entrant dans la composition du gel de séparation	- Tris-HCl 1,5 M - SDS 0,4% pH 8.45
Bleu de chargement	Solution utilisée lors du chargement des polymères de glycane sur gels de polyacrylamide.	- Tris-HCl 60 mM - Glycérol 25% (V/V) - SDS 2% (W/V) - bleu de bromophénol 0,1% (W/V)
<u>Western blot</u>		
Tampon de transfert	Tampon utilisé lors du transfert des protéines du gel acrylamide sur la membrane en PVDF.	- Tris-HCl 25 mM pH 8,3 - glycine 192 mM - méthanol 20 % (V/V) pH 8.3
TBS (Tris buffer saline)	Tampon utilisé et complété lors des différents bains du western blot.	- Tris-HCl 20 mM - NaCl 137 mM. pH 7,6

		Le tampon TTBS correspond au TBS auquel du Tween-20 a été ajouté à la concentration finale de 0,1 %.
--	--	---

Tableau III.3 : Solutions et tampons utilisés en fonction de l'expérience ou de la protéine à purifiées.

1.10. Divers

L'**IPTG** (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (Fermentas GMBH, St Leon-Rot, Allemagne) induit la transcription des gènes régulés par le promoteur-opérateur de l'opéron lactose, sans être métabolisé.

Le **L-arabinose** (Sigma-Aldrich) induit de manière proportionnelle à sa concentration le promoteur *araBAD* de l'opéron arabinose.

1.10.1. Marqueurs de taille

1.10.1.1. Marqueur de taille pour l'ADN

Le marqueur « O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder » (Fermentas) est utilisé pour estimer la taille des fragments d'ADN déposés sur gel d'agarose.

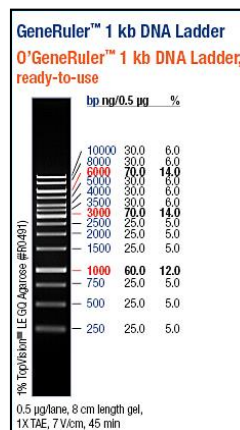


Figure III.2 : « O'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder »

1.10.1.2. Marqueur de taille pour les protéines

Le « Unstained Protein Molecular Weight Marker » (Fermentas) est un marqueur utilisé en SDS-PAGE pour évaluer la taille des protéines entre 14,4 et 116 kDa.

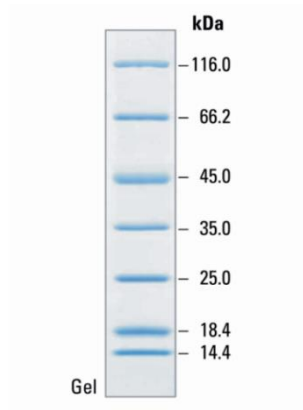


Figure III.3 : « Unstained Protein Molecular Weight Marker »

1.10.1.3. Marqueur de taille pour les Western Blots

Le marqueur « PAGE Ruler prestained protein ladder » (Fermentas) est utilisé pour suivre la migration et estimer la taille des protéines déposées sur gel de polyacrylamide lors d'un western blot.

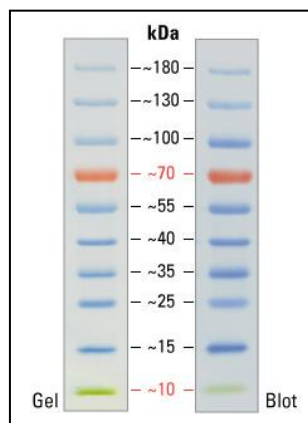


Figure III.4 : « PAGE Ruler prestained protein ladder »

2. Méthode

2.1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier un gène ou une partie d'un gène d'intérêt afin d'obtenir une quantité suffisante de matériel génétique. Elle est aussi utilisée pour réaliser de la mutagenèse dirigée.

Dans ce travail, nous avons utilisé la PrimeSTAR® HS DNA Polymerase ou la Q5® High-Fidelity DNA Polymerase.

2.1.1. Q5® High-Fidelity DNA Polymerase

Mélange réactionnel	Programme d'amplification
Master Mix Q5 1x contenant : 1 unité de polymérase 200 µM de chacun des 4 dNTPs 1,5 mM de MgCl ₂ Le tampon adéquat 1µM de chacune des amorces 150 à 250 ng de matrice ADN	Dénaturation initiale : 96°C 2 min Dénaturation : 96°C Hybridation 1 min à la valeur de T _m des amorces utilisées Elongation : 72°C (30 secondes/kb) Extension finale : 72°C 5 min

Tableau III.4 : Protocole pour les PCR avec la Q5® High-Fidelity DNA Polymérase.

2.1.2. PrimeSTAR® HS DNA Polymerase

Mélange réactionnel	Programme d'amplification
PrimeSTAR Buffer (Mg ₂₊ plus) 1x 1,25 unité de polymérase 200 µM de chacun des 4 dNTPs 1 µM de chacune des amorces 150 à 250 ng de matrice ADN	Dénaturation initiale : 98°C 1 min Dénaturation : 98°C 30 secondes Hybridation 1 min à T _m -5°C des amorces utilisées Elongation : 72°C (30 secondes/kb) Extension finale : 72°C 5 min

Tableau III.5 : Protocole pour PCR avec la PrimeSTAR® HS DNA Polymérase

2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

La migration dans un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium a pour but de séparer les fragments d'ADN selon leur taille. Le gel est placé dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 2 mM EDTA) entre deux bornes au niveau desquelles une tension est appliquée. Le gel est composé de 0,8 % à 2 % d'agarose selon la taille du fragment que l'on veut visualiser, de tampon TAE et complétement de 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui s'insère entre les bases de l'ADN et le rend visible sous lumière UV. Avant d'être déposé sur gel les échantillons sont complétement d'un agent de charge coloré, l'« Orange DNA Loading Dye » (Thermo Scientific) et la migration se déroule à 120 V pendant 25 minutes. Le gel est révélé par illumination aux UV à l'aide d'un transilluminateur Vilbert Lourmat (Proxylab SPRL).

2.3. Purification de l'ADN

L'ADN peut être purifié à partir d'un gel d'agarose, d'un mélange PCR ou encore d'une digestion enzymatique. Dans tous les cas, l'ADN est purifié à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Postfach, Düren, Allemagne).

2.4. Digestion enzymatique

Lors d'une digestion enzymatique, entre 1 et 2 µg d'ADN sont digérés par 10 unités/µg d'ADN des enzymes adéquates dans du tampon FastDigest Green Buffer 1× (Thermo Scientific) à 37°C pendant 30 minutes. Les enzymes sont ensuite inactivées à 80°C pendant 10 minutes.

2.5. Clonage des fragments d'ADN

Le plasmide et le fragment d'ADN à insérer sont tous deux digérés par la même paire d'enzymes de restriction et purifiés à partir d'un gel d'agarose. Les produits de digestion sont alors utilisés pour réaliser une ligation dites à bouts-collants. 100 ng de plasmide sont utilisés pour la ligation et plusieurs rapports molaires insert/plasmide allant de 1/3 à 1/6 sont testés (Calcul réalisé par le logiciel LIGATION CALCULATOR). Enfin, on ajoute la quantité adéquate de T4 ligase et son tampon. La ligation est laissée à 4°C pendant 16 heures puis 4 heures à 16°C et enfin à température ambiante 30 minutes.

2.6. Oligonucleotide annealing

Les inserts de type « oligonucleotide annealing » sont privilégiés lorsque l'insert est en dessous de la centaine de paires de bases. Cela consiste à utiliser deux oligonucléotides complémentaires contenant l'ensemble de la séquence à insérer. Pratiquement, en mélangeant 2 µM des deux oligonucléotides dans le tampon adéquat (Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM ; NaCl 50 mM). Le mélange est mis à 100°C pendant 5 minutes puis on le laisse refroidir à température ambiante.

2.7. Cellules compétentes et transformation

La transformation permet l'introduction d'ADN recombiné dans des cellules bactériennes dites « compétentes ». La compétence des cellules d'*E. coli* est obtenue par perméabilisation de la membrane des cellules par la méthode d'Inoue (Inoue *et al.*, 1990). La transformation pour les manipulations d'ADN est réalisée en cellules *E. coli* Mach-1. Alors que les cellules *E. coli* C43 (DE3), Lemo 21 (DE3) ou encore LMG 194 sont transformées pour la production de protéines recombinantes et les études de localisation *in vivo*.

2.7.1. Préparation de cellules « ultra-compétentes » par la Méthode Inoue

Les cellules sont mises en culture à 18°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,5 ; elles sont alors refroidies sur glace 10 minutes. Elles doivent impérativement rester à 4°C tout au long des

étapes de manipulation. Les cultures sont ensuite centrifugées à 2800g (Beckman Allegra X-15R) pendant 15 minutes à 4°C et le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont ensuite resuspendues délicatement dans 35% de volume de culture de tampon Inoue (MnCl₂ 55mM, CaCl₂ 15mM, KCl 250mM, PIPES 10mM pH 6.7). Les cellules sont à nouveau centrifugées à 2800 g pendant 15 minutes à 4°C, le tampon est éliminé et les cellules sont resuspendues dans 8 % du volume de culture de tampon Inoue. Enfin, on ajoute 0,6 % de volume de DMSO (**dimethyl sulfoxide**) et les cellules sont laissées 10 minutes sur glace. Les cellules maintenant compétentes sont aliquotées par 100 µL dans des tubes Eppendorfs pré-refroidis sur glace et stockées à -80°C (Inoue *et al.*, 1990).

2.7.2. Transformation des cellules d'*E. coli*

La transformation est induite par un choc thermique. Un aliquot de cellules compétentes est mis en contact avec 4 µL de produit PCR (pour la mutagenèse dirigée voir 2.11) ou la totalité d'un produit de ligation ou 2 µL de vecteur purifié. Après 15 minutes sur glace, les cellules sont incubées 45 secondes à 42°C puis le mélange est immédiatement refroidi sur glace durant 2 minutes. On ajoute ensuite 700 µL de milieu SOC et les cellules sont mises à incuber, sous agitation, pendant 1h30 à 2h, à 37°C. La suspension bactérienne est étalée (100 µL à 200 µL selon les cas) sur une boîte LB agar avec l'antibiotique de sélection adéquat. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

2.8. Purification de l'ADN plasmidique

L'extraction des plasmides est réalisée à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).

2.9. Dosage de l'ADN

La mesure de la concentration en ADN est réalisée grâce au Nanovue Spectrophotomètre (GE HealthCare, Little Chalfont, Royaume-Uni). L'absorbance de l'échantillon est mesurée à 260 nm. Une indication de la pureté de l'échantillon est également déterminée par mesure du rapport d'absorbance A260/A280, ce rapport permet de révéler une contamination par des protéines. La qualité de l'ADN est considérée comme acceptable si le rapport est supérieur à 1,8.

2.10. Séquençage

Le séquençage des constructions ADN et des mutants est réalisé par la méthode de Sanger. Les échantillons (20 µL) contenant l'ADN plasmidique à 50 ng/µL, 2,5 µM d'amorce propre au type de plasmide utilisé et de l'eau stérile sont envoyés à la plateforme GIGA-Génomique de l'université de Liège.

2.11. Mutagenèse dirigée du domaine AMIN

La mutagenèse dirigée est réalisée par PCR à l'aide d'oligonucléotides complémentaires contenant la mutation désirée et s'hybridant sur le gène du domaine AMIN compris soit dans le pET28MHL soit le pJET1.2. L'ensemble du plasmide est ainsi amplifié tout en insérant la mutation désirée dans le gène du domaine AMIN.

Mutations des résidus du feuillet β interne (1)		
Mutations	pJET1.2	pET28MHL
R40A	/	/
R49A	OK	OK
E53A	OK	/
K122A	/	/
F126A	OK	OK
L128A	OK	/
R137A	OK	/
D141A	/	OK
Mutations des résidus du feuillet β externe (2) et des résidus provenant de l'étude RMN		
Mutations	pJET1.2	pET28MHL
K59A	OK	OK
F63A	OK	OK
L65A	OK	/
R70A	OK	OK
D74A	OK	OK
I75A	OK	OK
R102A	/	OK
V103A	OK	OK
G104A	OK	OK
F106A	OK	OK
v111A	OK	/
R112A	OK	OK
M113A	OK	OK
F115A	OK	OK
E116A	OK	OK
L117A	OK	OK
V103A/G104A	/	OK
F63A/L65A	/	/
R102A/V103A/G104A	/	OK

Doublés mutations des résidus conservés sur les feuillets β 1 et 2		
Mutations	pJET1.2	pET28MHL
R40A/R102A	/	OK
R49A/R112A	/	OK
E53A/E116A	/	OK
K122A/K59A	/	OK
F126A /F63A	OK	/
L128A/L65A	OK	OK
R137A /R70A	OK	OK
D141A /D74A	/	OK
Mutations des résidus des motifs RXXXD/E feuillet β 2		
Mutations	pJET1.2	pET28MHL
R70A/D74A	/	OK
R112A/E116A	/	OK
Mutations des résidus du modèle bio-informatique		
Mutations	pJET1.2	pET28MHL
R70A/R112A	/	OK
R112K	/	OK
R102A/E116A	/	OK
E116Q	OK	OK

Tableau III.6 : Ensemble des mutants réalisés en vecteur de clonage pJET1.2 et/ou en vecteur de production pET28MHL. / : non disponible OK : disponible

2.12. Construction du vecteur de localisation du domaine AMIN

Dans un premier temps, nous avons inséré par hybridation et ligation (oligo-anneling) la séquence contenant une région de connexion (linker) entre les sites NcoI et HindIII du pBAD dont le site NdeI en position 2840 a préalablement été muté. Cette séquence comprend l'ensemble des sites de restrictions nécessaire à la construction du vecteur (Fig. III.5). Ensuite, nous avons inséré de nouveau par hybridation et ligation (oligo-annealing) le peptide signal d'AmiC entre les sites NcoI et NdeI (Fig. III.5). La sfGFP a été amplifiée à partir du vecteur pTHV037-sfGFP fournit par le Dr. den Blaauwen de l'université d'Amsterdam, Pays-Bas. La séquence codante pour la sfGFP est amplifiée avec des oligonucléotides (sfGFP For BGI ; sfGFP_Rev HindIII) permettant l'insertion des sites BglII et HindIII aux extrémités du produit PCR. Après digestion, la sfGFP est insérée au reste de la construction dans le pBAD. Enfin, le domaine AMIN et certains de ses mutants ont été placés dans le vecteur entre les sites NdeI et XhoI (Fig. III.5).

<i>Plasmides</i>	<i>Constructions</i>	<i>Souche d'E. coli</i>	<i>Do_{600nm} induct.</i>	<i>T° induct.</i>	<i>Tps induct.</i>	<i>IPTG mM</i>
<i>pDML2400</i>	pET28a, His- <i>ftsW</i>	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pDML2040</i>	pETDuet, His- <i>ftsI</i> , <i>ftsW</i>	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pDML2041</i>	pETDuet, His- <i>ftsW</i> , <i>ftsI</i>	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pDML2043</i>	pETDuet, His- <i>ftsI</i> , <i>ftsW</i> (293HA)	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pDML2045 + pDML2040</i>	pACYCDuet, <i>ponB</i> , <i>ftsN-S</i> . <i>tag+ pETDuet, His-ftsI</i> , <i>ftsW</i>	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pCIP1000</i>	pETDuet, His- <i>ftsW</i> , <i>ponB</i>	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pCIP1083</i>	pETDuet, His- <i>ftsW</i> _{HA} , <i>ponB</i>	C43 (DE3)	0.6	37°C	4-5h	1
<i>pET28MHL-WSe</i>	pET28MHL, His- <i>ftsW</i> Se	Lemo (DE3)	0.4	22°C	16h	0.8
<i>pET28MHL-WKp</i>	pET28MHL, His- <i>ftsW</i> Kp	Lemo (DE3)	0.4	22°C	16h	0.8
<i>pCIP1051</i>	pETDuet, His- <i>murJ</i>	C43 (DE3)	0.4	22°C	16h	0.2

Tableau III.7 : Conditions de production des protéines et complexes de protéines membranaires

2.13.2. Préparation des membranes

Les culots bactériens sont suspendus dans le tampon de lyse approprié, complété de benzonase (1,5 U/mL), à raison de 10 mL de tampon par gramme de cellules puis passés 3 fois au désintégrateur cellulaire (Emulsiflex-C3, AVESTIN, Inc., ON, Canada). Après lyse, une centrifugation de 15 min à 4000 g est réalisée pour éliminer les débris cellulaires et les cellules non lysées. Le lysat est ensuite ultracentrifugé 1 heure (Beckman, 2-35 ultracentrifuge, ANALIS SA, Suarlée, Belgique) à 215000 g, à 4°C. Le culot de membranes est, selon les cas repris ou non dans un tampon de lavage et ultracentrifugé 1 heure à 215000 g. Les culots de membranes obtenus peuvent ensuite être conservés à -20°C.

2.13.3. Préparation des protéines et complexes d'intérêt

Les membranes sont solubilisées à l'aide d'un Potter dans un tampon d'extraction, dans les conditions reprises dans le tableau III.8. Plus précisément, 1 gr de membranes est repris dans 10 mL de tampon d'extraction. Une nouvelle ultracentrifugation à 125000 g permet d'éliminer le matériel insoluble et de récupérer la protéine ou complexe de protéines dans le surnageant.

<i>Protéine/complexes</i>	<i>Détergent</i>	<i>T°</i>	<i>Temps</i>
<i>FtsW</i>	DDM	TA	1 heure
<i>His-PBP3-FtsW</i>	DDM	TA	1 heure
<i>His-FtsW-PBP3</i>	DDM	TA	1 heure
<i>His-PBP3-FtsW_{HA}</i>	DDM	TA	1 heure
<i>His-PBP3-FtsW-PBP1b</i>	LMNG	TA	1 heure
<i>His-FtsW-PBP1b</i>	LMNG	TA	1 heure
<i>His-FtsW_{HA}-PBP1b</i>	LMNG	TA	1 heure
<i>FtsW_{Se}</i>	DDM	4°C	~ 16h
<i>FtsW_{Kp}</i>	DDM	4°C	~ 16h
<i>MurJ</i>	DDM	TA	2 heures

Tableau III.8 : Conditions d'extraction des protéines et complexes de protéines membranaires. TA : température ambiante (~ 20°C).

2.13.4. Purification des protéines et complexes d'intérêt

Les protéines portent une queue poly-histidine et sont purifiées par chromatographie d'affinité IMAC (immobilized metal affinity chromatography). Les purifications sont effectuées sur colonne HisTrap HP (Haute Performance) (GE Healthcare) contenant une matrice Nickel Sépharose à l'aide d'un appareil Äkta prime plus (GE Healthcare) ou par la méthode de purification dite « en batch » avec la résine Ni-NTA-Sépharose (GE Healthcare). Cette procédure consiste à fixer la protéine sur la résine puis à charger le complexe protéine-résine sur une colonne vide (Biorad, Hercules, Californie, États-Unis) pour ensuite effectuer par gravité les étapes de lavage et d'élution. Dans les deux cas, la colonne est équilibrée avec le tampon de purification adéquat (Tableau III.3). L'échantillon est chargé, la colonne est ensuite lavée avec ce même tampon. L'élution est réalisée avec un gradient continu ou discontinu en imidazole allant de 0 ou 50 mM à 1000 mM. Après analyse SDS-PAGE, les fractions contenant la protéine ou le complexe d'intérêt sont rassemblées et l'échantillon est dessalé sur une colonne Sephadex G25 (GE Healthcare) préalablement équilibré dans le tampon adéquat (Tableau III.3). L'échantillon est ensuite concentré à l'aide d'un Amicon® (Millipore, Burlington, Massachusetts, États-Unis) de « Cut-off » adapté à la protéine ou au complexe purifié. La concentration de la protéine ou du complexe ainsi obtenu est déterminée à l'aide du Kit BCA (Thermo Scientific). Avant l'analyse SDS-PAGE les échantillons contenant des PBPs sont marqués avec 2,5 µM d'ampicilline fluorescente pendant 30 minutes à 37 °C.

2.13.5. Production d'AmiC, du domaine LytM, du domaine AMIN et de ses mutants

Après transformation des cellules compétentes par le plasmide d'intérêt, on sélectionne les transformants sur des boîtes LB-agar complémenté de kanamycine. A partir de ces transformants une pré-culture est réalisée sur la nuit en milieu LB kanamycine. Les cultures sont inoculées en diluant la pré-culture 100 fois dans le milieu TB kanamycine. La culture est placée à 37°C, sous agitation constante de 250 rpm, jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,8. L'expression de la protéine d'intérêt est alors induite avec 0,5 mM d'IPTG pendant 3 heures à

28°C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 15°C, 20 minutes à 8000 g, les culots peuvent être conservés à -20°C.

Pour les mutants du domaine AMIN, selon les cas, la température et le temps d'induction peuvent varier.

2.13.6. Purification d'AmiC, du domaine LytM, du domaine AMIN et de ses mutants

Les culots bactériens sont suspendus dans le tampon de lyse approprié, complété de benzonase (1,5 U/mL), à raison de 10 mL de tampon par gramme de cellules puis passés 3 fois au désintégrateur cellulaire. Après lyse, une centrifugation de 30 min à 40 000 g est réalisée pour éliminer les débris cellulaires et les cellules non lysées. Les protéines disposent d'une queue poly-histidine et sont purifiées de la même façon qu'au point 2.13.4. L'élution se fait par paliers d'imidazole allant de 0 à 500 mM. Après analyse SDS-PAGE de la purification, les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées et l'échantillon est dessalé sur une colonne Sephadex G25 préalablement équilibrée dans le tampon adéquat.

L'étiquette histidine peut ensuite être clivée par la protéase TEV. L'échantillon de protéine est incubé sur la nuit à 4°C en présence de la TEV (rapport 1/10) et repassé sur une colonne de nickel-Sépharose. La protéine ne portant plus d'étiquette se retrouve dans la fraction non fixée tandis que la TEV qui porte une étiquette histidine reste sur la matrice de la colonne. Une élution à 10 mM d'imidazole est effectuée afin de récupérer la protéine si celle-ci présente une faible affinité pour la colonne malgré l'absence d'étiquette histidine. L'ensemble des fractions contenant la protéine dépourvue d'étiquette est ensuite concentré sur Amicon® de « Cut-off » adapté à la protéine. La concentration de la protéine est ensuite déterminée à l'aide du Kit BCA.

2.13.7. Production en milieu minimum d'AmiC et du domaine AMIN

Après transformation des cellules compétentes par le plasmide d'intérêt, on sélectionne les transformants sur des boîtes LB-agar complété de kanamycine. A partir de ces transformants une pré-culture est réalisée sur la nuit en milieu LB kanamycine. A partir de la DO_{600nm} de la pré-culture, on prélève le volume nécessaire pour ensemercer à une DO_{600nm} de départ de 0,1 les cultures en milieu M9. Ce volume calculé est centrifugé à 2000 g pendant 30 minutes à 20°C et le culot de cellules obtenu est rincé avec du milieu M9 et ensuite à nouveau centrifugé. Après une nouvelle suspension dans du milieu M9, ces cellules sont ensuite utilisées pour ensemercer les cultures en erlens de 2 litres. La culture est placée à 37°C, sous agitation constante de 250 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,8. L'expression de la protéine d'intérêt est alors induite par ajout de 0,5 mM d'IPTG pendant 3 à 4 heures à 37°C. Les cultures sont ensuite centrifugées à 15°C, 20 minutes à 8000 g. Les culots peuvent être conservés à -20°C. Les protéines sont ensuite purifiées comme en 2.13.6

2.13.8. Purification par chromatographie d'exclusion de taille

Pour les protéines ou complexes destinés à la cristallographie ou à la RMN, une purification supplémentaire par filtration sur gel est réalisée à l'aide d'une colonne Superdex 200 ou 75 10/30 (GE Healthcare) montée sur un système FPLC Äkta® Explorer. Cette étape permet d'une part d'améliorer encore la pureté de la protéine ou du complexe et d'autre part d'éliminer d'éventuels agrégats ou de changer le tampon de la protéine.

2.13.9. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

Cette technique permet de séparer les protéines suivant leur masse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (0,1% (W/V)). Le gel de polyacrylamide se compose de deux parties :

- Un gel de concentration formé d'acrylamide 6% dans du Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 qui permet, sous l'effet d'une différence de pH, de rassembler l'échantillon en un mince front de migration à l'entrée du gel de séparation.
- Un gel de séparation formé de 12% ou 15% d'acrylamide (ce pourcentage dépend de la taille de la protéine à analyser) dans du Tris-HCl 1,5 M pH 8,5. Son rôle est de séparer les protéines selon leur taille.

La polymérisation est catalysée par l'ajout de 0,1% (V/V) de TEMED (N, N, N', N'-**tétraméthyléthylènediamine**) et de 1% (V/V) de **persulfate d'ammonium** (APS).

Les échantillons protéiques sont additionnés de 1/5 de volume de bleu dénaturant et porté à 95°C pendant 5 minutes. Cependant, s'il s'agit de protéines membranaires, les échantillons ne sont pas chauffés afin d'éviter la formation d'agrégats mais incubés 15 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite chargé au sommet du gel de concentration.

L'électrophorèse est réalisée à 150 V dans le tampon TGS. Une fois la migration achevée, le gel est coloré au bleu « PageBlue Protein Staining Solution » (Thermo Fisher) et décoloré à l'eau. Si les échantillons analysés contiennent des PBPs, une révélation du marquage à l'ampicilline fluorescente est réalisée préalablement, grâce au Typhoon Trio⁺ (GE Healthcare) avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm et d'émission à 520 nm.

2.14. Analyse des polymères de glycane par SDS-PAGE.

Cette technique permet de visualiser les différentes tailles de chaînes de glycanes ainsi que le pontage de celles-ci (Barrett *et al.*, 2007).

2.14.1. Préparation des échantillons

Le [¹⁴C]-lipide II (concentration finale de 4 µM, 0.155 µCi. nmol⁻¹) contenu dans un mélange chloroforme/méthanol (50/50) est séché et ensuite repris dans un tampon HEPES 50 mM pH 7,5 ; NaCl 200 mM ; décyl polyéthylène glycol 0,025% (W/V) ; CaCl₂ 10 mM et 10% (V/V) de DMSO. Les protéines dont on veut voir l'influence sur l'activité de PBP1b sont ensuite ajoutées à une concentration de 3 µM et en dernier lieu, on ajoute la PBP1b ou la PBP1bS510A à une

concentration finale de 100 nM. Le volume total de réaction est de 20 μ L. Les réactions sont incubées à 37°C pendant 1 heure et arrêtées par ajout de 1 μ L de flavomycine 5 mM. Les échantillons sont ensuite évaporés au Speedvac (Thermo Scientific) pour atteindre un volume d'environ 5 μ L auquel est ajouté 5 μ L de bleu de chargement.

2.14.2. Gel de séparation

Le gel de polyacrylamide ne se compose que d'un gel de séparation qui contient 9% d'acrylamide dans le tampon K. Les échantillons sont chargés sur le gel qui est mis à migrer à 100 V, à 4°C jusqu'à ce que la ligne de bleu de bromophénol soit à 1 cm du bas du gel. Les chaînes de glycane vont se séparer selon leur taille et les chaînes pontées par transpeptidation resteront dans le puits. Le gel est ensuite séché pendant une heure sous vide avant d'être exposé minimum une nuit contre un écran de phosphore (GE Healthcare). Ce dernier est révélé avec un Typhoon Trio⁺ et les images analysées avec le programme ImageQuant (GE HealthCare).

2.14.3. Analyse de l'interaction lipide II-FtsW

La procédure se déroule de la même manière que dans le cas précédent à quelques différences près. Premièrement, le SDS est retiré du gel ainsi que du bleu de chargement et utilisé seulement dans le tampon de migration. Deuxièmement, nous travaillons avec du NBD-lipide II a une concentration finale de 10 μ M. Enfin, le lipide étant fluorescent, la révélation s'effectue directement sur le Typhoon Trio⁺. Les longueurs d'excitation et d'émission du NBD étant de 466 nm et 539 nm respectivement.

2.15. Analyse de l'interaction lipide II-protéine par Native-PAGE

5 ou 10 μ M de FtsW, MurJ ou FtsW-PBP3 sont ajoutés à 10 μ M de NBD-lipide II. Ensuite, 5 % de sucrose est ajouté aux échantillons avant d'être déposés sur un gel gradient 4-15 % dépourvu de SDS. Un échantillon témoin composé uniquement de bleu de chargement est déposé afin de pouvoir suivre la migration visuellement. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon glycine pH 10.6, à 70 V à 4°C jusqu'à ce que le témoin soit à 1 cm du bas du gel (Gallagher, 2001). Avant d'être coloré au bleu de Coomassie, le gel est révélé avec un Typhoon Trio⁺ et les images sont analysées avec le programme Image Quant.

2.16. Tests d'activité GTase en fluorescence continue

Cette méthode nous permet de suivre l'activité du PBP1b *in vitro* en présence de dansyle-lipide II comme substrat (Egan and Vollmer, 2016). Le principe du test de suivi de l'activité glycosyltransférase par fluorescence continue repose sur le comportement du dansyle, le fluorophore couplé au lipide II, en fonction de l'hydrophobicité de son environnement. En effet, la propriété de certains fluorophores à voir leur rendement quantique augmenter de manière significative dans des environnements hydrophobes peut être utilisé comme base pour le suivi d'activité enzymatique par fluorescence (Pompliano *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*,

2002). A proximité de la partie lipidique du lipide II, le dansyle présente une fluorescence élevée. La polymérisation du dansyle-lipide II en chaînes de glycanes est suivie de la digestion de ces chaînes par une muramidase (Fig. III.6). Cette digestion entraîne la perte du fragment lipidique et la formation de muuropeptides couplé au dansyle. Il s'en suit une diminution de la fluorescence que l'on peut observer en temps réel (Fig. III.6). De plus, le dansyle est attaché à l'acide aminé en position 3 du pentapeptide du lipide II empêchant ainsi toute activité transpeptidase. Par conséquent, l'activité glycosyltransférases peut être spécifiquement suivie par la réduction de la fluorescence dans le temps (Fig. III.6).

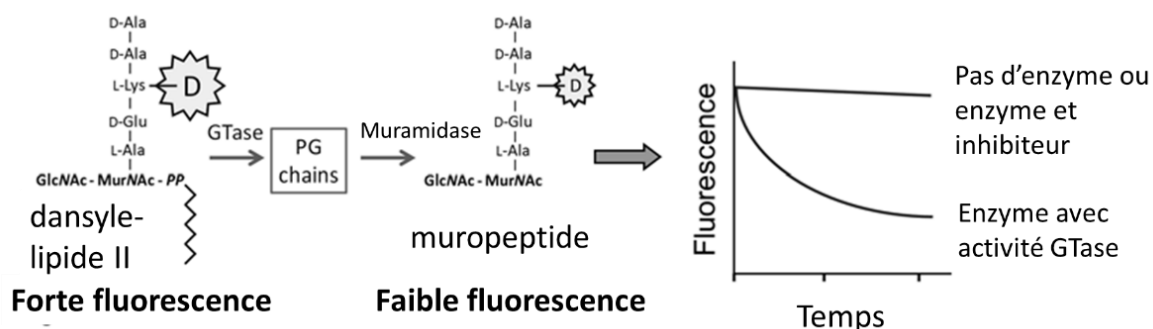


Figure III.6 : Principe du dosage de l'activité glycosyltransférases avec le dansyle-lipide II. (Egan and Vollmer, 2016)

Pratiquement, 10 μM de dansyle-lipide II ainsi qu'une unité de N-actétylmuramidase de *Streptococcus globisporus* (Calbiochem, Millipore) sont repris dans un tampon de réaction constitué de 50 mM HEPES pH 7.5 ; NaCl 200 mM ; CaCl_2 10 mM ; décyl-PEG 0,02% (W/V) et DMSO 20 % (V/V). Les protéines ou complexes de protéines sont utilisés à une concentration finale allant de 0,5 à 5 μM excepté LpoB, à 200 nM. Enfin, on ajoute en dernier 50 nM de PBP1b pour démarrer la réaction. Le mélange est effectué dans une microplaque noire de 96 puits (Greiner Bio One, Kremsmünster, Autriche) et la diminution de fluorescence est mesurée pendant 20 minutes à l'aide du lecteur de microplaque Infinite 200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland) aux longueurs d'excitation et d'émission de 340 nm et 520 nm respectivement.

2.17. Analyse de l'activité GTase par chromatographie sur couche mince (TLC)

2.17.1. Préparation des échantillons

Le [^{14}C] -lipide II (concentration finale de 4 μM , 0.155 $\mu\text{Ci. nmol}^{-1}$) contenu dans un mélange chloroforme/méthanol (50/50) est séché et ensuite repris dans un tampon HEPES 50 mM pH 7 ; NaCl 200 mM ; DDM 0,05% (W/V) ; MgCl_2 20 mM ; CaCl_2 20 mM et 20% (V/V) de DMSO. Les protéines FtsW de *K. pneumoniae* ou *S. enterica* sont ajoutées à une concentration finale de 2 μM et la réaction est incubée 2 heures à 30°C. Un témoin avec 100 nM de PBP1b est réalisé dans les mêmes conditions.

4 μL d'échantillon sont déposés tous les deux centimètres sur une plaque de silice (Silica gel on TLC AL foils, Sigma-Aldrich) puis séchés. L'opération est répétée jusqu'au dépôt de l'ensemble du produit de réaction. La plaque est ensuite déposée dans une cuve contenant le mélange : eau 10 % (V/V), isopropanol 60 % (V/V) et ammoniac 30 % (V/V). La plaque est retirée lorsque la phase mobile atteint 5 cm du bord de celle-ci. Elle est mise à sécher avant d'être placée contre un écran de phosphore. Ce dernier est révélé avec un Typhoon Trio⁺ et les images sont analysées avec le programme Image Quant.

2.18. Analyse HPLC des produits de réaction de synthèse du peptidoglycane in vitro

Les analyses HPLC (**H**igh **P**ressure **L**iquid **C**hromatography) des produits de réaction de synthèse du peptidoglycane ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Alexander Egan du laboratoire de Waldemar Vollmer à l'université de Newcastle, Royaume Uni. Le lipide II séché (concentration finale de 15 μM) est repris dans 5 μL de DDM 0,1%. Les différentes protéines sont ensuite ajoutées à 2 ou 5 μM de FtsW ou du complexe FtsW-PBP3 avec ou sans 2 μM de LpoB (soluble). On ajoute 0,5 μM de PBP1b en dernier lieu et la réaction est incubée 2 heures à 37°C soit dans un tampon HEPES 10 mM pH 7.5 ; NaCl 200 mM ; DDM 0,04% (W/V) ; MgCl_2 3 mM soit en HEPES 20 mM pH 7.5 ; NaCl 25 mM ; DDM 0,05% (W/V) ; MgCl_2 10 mM, et 10% de DMSO (V/V) (Biboy *et al.*, 2013). Le produit de réaction subit ensuite une digestion par une muramidase (Cellosyl) et une réduction avec du borohydrure de sodium. Les mucopeptides sont séparés sur une colonne à phase inversé ProntoSil 120-3-C18 AQ et détectés par un compteur à scintillation (Biboy *et al.*, 2013).

2.19. Western blot

Les protéines préalablement séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de PVDF (Millipore) grâce à l'appareil de transfert (Hoefler Semiphor, Amersham Biosciences, Uppsala, Suède). Le transfert se fait pendant 50 minutes sous une intensité de 40 mA par gel dans le tampon de transfert. La membrane est ensuite incubée dans une solution de blocage (solution TTBS ; 0,2% BSA) pendant une heure à température ambiante ou pendant une nuit à 4°C. La membrane est alors lavée 3 fois 15 minutes avec le tampon TTBS. Ensuite, la membrane est incubée avec des anticorps de souris monoclonaux anti-HA dilués 500X (Abcam, Cambridge, Royaume Unis) pendant 1 heure à température ambiante. Ces anticorps permettent de détecter l'épitope HA qui est un peptide (YPYDVPDYA) dérivé de l'hémagglutinine du virus influenza. Après 3 lavages au TTBS, elle est mise en contact avec des anticorps de chèvre anti-souris couplés à la HRP et dilués 1500X (Millipore). Après trois lavages, la membrane est révélée à l'aide du Kit ECL (Biorad) grâce à un réactif chimioluminescent. La membrane est révélée avec l'appareil Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) et l'image est analysée par le programme Image Quant.

2.20. Production et purification du peptidoglycane

Le peptidoglycane est purifié à partir de cellules *E. coli* MC1061 (Glauner *et al.*, 1988). Une pré-culture en LB est préparée à partir d'un stock en glycérol et agitée à 37°C pendant la nuit. Les cultures sont inoculées en diluant la pré-culture 100 fois dans du LB et sont placées à 37°C, sous agitation constante de 250 rpm jusqu'à atteindre une DO_{600nm} entre 0,5 et 0,7. Les cultures sont ensuite centrifugées à 15°C, 20 minutes à 8000 g. Les culots sont ensuite suspendus dans de l'eau MilliQ froide et ajoutés goutte à goutte dans du SDS 8 % bouillant en agitant régulièrement. Une fois la totalité de la suspension ajoutée au SDS, la solution est mise à bouillir pendant une heure. On laisse la solution refroidir à température ambiante avant de centrifuger à 215 000 g pendant 40 minutes à 20°C. Les culots sont ensuite rincés avec de l'eau MilliQ tempérée et centrifugés 1 heure à 215 000 g, à 20°C. Cette opération est répétée jusqu'à l'élimination complète du SDS. Les culots sont alors suspendus dans un tampon 20 mM phosphate pH 6.9 ; 7mM de NaCl contenant 200 µg/mL d'α-amylase et incubés une nuit à température ambiante sur portoir rotatif. Le lendemain, la solution est centrifugée à 215 000g pendant une heure et les culots sont ensuite suspendus dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8 contenant 500 µg/mL de pronase et 200 µg/mL de trypsine. La solution est à nouveau incubée une nuit à température ambiante sur portoir rotatif. S'en suit une nouvelle centrifugation à 215 000g pendant 1 heure. Le culot de peptidoglycane est ensuite lavé deux fois à l'eau MilliQ et finalement suspendu dans de l'eau MilliQ supplémentée de 0,02 % d'azide.

2.21. Test in vitro de liaison au peptidoglycane

10 µg de protéine sont incubés deux heures à 4°C, avec ou sans 20 µL de peptidoglycane à 1 mg/mL dans le tampon de liaison, dans un volume final de 100 µL. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 20 minutes à 14 000 g, à 4°C. Les culots sont lavés deux fois dans 150 µL de tampon de liaison puis suspendus dans 40 µL de SDS 2 % et incubés pendant une heure sur paillasse. Le surnageant, le premier et deuxième lavage ainsi que l'éluat sont analysés par SDS-PAGE. Les protéines liants le peptidoglycane apparaissent dans la fraction de l'éluat tandis que les protéines qui n'interagissent pas avec le peptidoglycane apparaissent dans le surnageant.

2.22. Analyse par RMN de l'interaction AMIN-peptidoglycane

Les analyses RMN (**R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire) ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Jean-Pierre Simorre de l'institut de Biologie Structurale IBS2 de Grenoble, France. Après avoir produit et purifié le domaine AMIN marqué comme décrit précédemment (2.13.7 et 2.13.8), la protéine est envoyée dans le tampon RMN à Grenoble où, après ajout de 10 % de D₂O, elle est concentrée à 130 µM. Les expériences 2D et 3D ont été collectées sur des spectromètres Brüker de fréquence proton 600, 850 et 900 MHz à une température de 293 K. Les données brutes obtenues sont traitées par le logiciel NMRPipe. L'ensemble des spectres ainsi traités est transféré dans le logiciel d'analyse CcpNmr en vue de leur attribution ou interprétation.

2.23. Cristallisation du domaine LytM de NlpD

Le domaine LytM de NlpD a été produit et purifié comme décrit précédemment (2.13.5 et 2.13.6), la protéine a ensuite été concentrée à 8,3 mg/ml dans une solution contenant 0,1 M de NaCl et 30 mM de tampon tris-HCl à pH 7,5, et cristallisé à 20 °C en utilisant la méthode de diffusion de vapeur en gouttes assises. La goutte de 0,5 µl consistait en un mélange 3 :2 (v/v) de la solution protéique et une solution de puits contenant 0,2 M NaCl, 26,8% (w/v) de polyéthylène glycol 3350 et 0,1 M de tampon Tris-HCl à pH 9. Le cristal a été transféré dans une solution cryoprotectrice contenant 45% (v/v) de glycérol et 25% (w/v) de polyéthylène glycol 6000 avant d'être plongé dans l'azote liquide.

Les données de diffraction ont été collectées sur la ligne Proxima1 du synchrotron Soleil à Paris, France. Les données ont été indexées, intégrées et mises à l'échelle en utilisant XDS (Kabsch,2010).

IV. Résultats

1. Chapitre 1 : synthèse du peptidoglycane

1.1. Expression et purification des complexes membranaires d'intérêt.

Les protéines directement responsables de la synthèse du peptidoglycane au site de division sont PBP1b et PBP3. Au vu des résultats récents, FtsW dans une moindre mesure participerait également à la synthèse (Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018). Leur accès au précurseur lipidique (lipide II) du peptidoglycane serait assuré par la potentielle flippase FtsW et/ou MurJ (Mohammadi *et al.*, 2011; Mohammadi *et al.*, 2014; Sham *et al.*, 2014; Meeske *et al.*, 2015; Kuk *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Bolla *et al.*, 2018). FtsW est une protéine constituée de 10 segments transmembranaires interagissant avec PBP3. Enfin, la protéine FtsN joue un rôle de régulation de cette synthèse en agissant directement sur le PBP1b mais aussi par ses multiples interactions avec d'autres membres du divisome. Des interactions deux à deux entre ces quatre protéines ont pu être mises en évidence par des expériences de doubles hybrides bactériens et confirmées *in vitro* excepté pour l'interaction entre FtsW-PBP1b et FtsW-FtsN (Di Lallo *et al.*, 2003; Karimova *et al.*, 2005; Bertsche *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007; Fraipont *et al.*, 2011). Afin d'étudier les interactions entre ces protéines et les effets de celles-ci sur la synthèse du peptidoglycane nous avons isolé et étudié différents complexes.

Pour isoler des complexes formés par les protéines FtsW, PBP3, PBP1b et FtsN, nous avons opté pour une stratégie consistant en la co-expression des protéines dans *E. coli*. Celle-ci est suivie par l'extraction des membranes à l'aide de détergents et la co-purification des complexes formés à l'aide d'une étiquette histidine porté par une seule des protéines exprimées (voir 2.13 du MetM). Pour ce faire, nous avons utilisé des vecteurs de type Duet, les vecteurs Duet utilisés permettant la co-expression des produits de deux gènes d'intérêt, après clonage de chacun des gènes dans un MCS précédé d'un promoteur reconnu par la T7 RNA polymérase. L'utilisation de deux vecteurs Duet compatibles permet l'expression simultanée des quatre protéines d'intérêt dans une même bactérie. La liste des constructions testées ainsi qu'un résumé des résultats obtenus se trouvent dans le Tableau IV.1 (p.95). Il est à noter qu'une autre méthode a été testée en parallèle mais n'a pas permis d'isoler de complexe. Celle-ci consistait en la purification des protéines séparément suivie d'une reconstitution des complexes *in vitro*. Il est possible que le complexe formé lors de la co-expression dans les membranes soit suffisamment stable pour ne pas se dissocier lors de la solubilisation alors que la présence de détergent dans le cas de deux protéines purifiées séparément peut interférer avec certaines interactions protéine-protéine.

1.1.1. Production et purification du complexe FtsW-PBP3

Dans un premier temps, nous avons utilisé les protéines FtsW et PBP3 pour éprouver notre stratégie avant de l'appliquer au reste des protéines. En effet, il a été démontré *in vivo* comme *in vitro* que PBP3 et FtsW forment un sous-complexe du divisome (Karimova *et al.*, 2005; Fraipont *et al.*, 2011). Nous avons donc co-exprimé ces deux protéines dans la souche *E. coli* C43 (DE3), solubilisé les membranes à l'aide de détergent (DDM), chargé les protéines sur une colonne d'affinité pour le nickel et procédé à l'élution avec un gradient d'imidazole. Les

fractions obtenues ont été analysées par SDS-PAGE après marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. Comme attendu, les résultats après coloration au bleu de Coomassie montrent que PBP3 et FtsW apparaissent dans les mêmes fractions d'élution, confirmant leur interaction. Ce résultat est le même que l'étiquette histidine soit portée par la protéine FtsW (pDML2041) ou par PBP3 (pDML2040) (Fig. IV.1A et C). On note que FtsW qui est une protéine de 45 kDa migre sur gel acrylamide SDS à un poids moléculaire apparent de ± 35 kDa. Cette différence de migration est couramment observée pour des protéines comportant plusieurs segments transmembranaires (Rath *et al.*, 2009). FtsW* correspond à une dégradation de FtsW identifiée auparavant au sein du laboratoire par spectrométrie de masse et western-blot avec des anticorps dirigés contre l'étiquette histidine. Enfin la présence de PBP3 est bien confirmée par le marquage à l'ampicilline fluorescente (Fig. IV.1B)

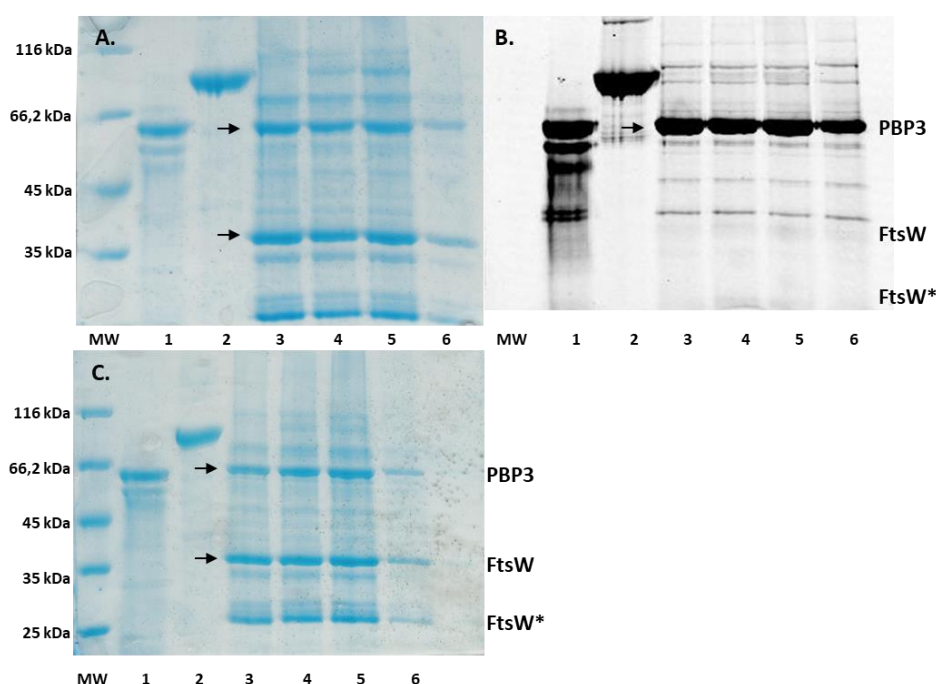


Figure IV.1 : Purification du complexe FtsW-PBP3. Analyse SDS-PAGE sur gel 12% et marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. **A.** purification du complexe His-FtsW-PBP3 (coloration au bleu de Coomassie) **B.** Révélation du marquage à l'ampicilline fluorescente du gel A. **C.** Purification du complexe HisPBP3-FtsW (coloration au bleu de Coomassie). **MW** : marqueur de poids moléculaire. **1** : PBP3 témoin, **2** : PBP1b témoin. **3-6** : élution du complexe dans le gradient d'imidazole.

1.1.2. Production et purification des complexes FtsW-PBP1b et PBP1b-PBP3

La même méthode a ensuite été appliquée pour les complexes FtsW-PBP1b (pCIP1000) et PBP1b-PBP3 (pCIP1082). Concernant le complexe FtsW-PBP1b la queue poly histidine est portée par FtsW et PBP1b est dépourvue d'étiquette. La purification de ce complexe a nécessité une adaptation des conditions préalablement établies pour le complexe FtsW-PBP3. En effet, la solubilisation des membranes par le DDM (40 mM), s'est révélée peu efficace pour extraire le complexe FtsW-PBP1b. Nous avons choisi de substituer le DDM par le LMNG qui est renseigné comme plus efficace pour l'extraction de complexes protéiques (Chaptal *et al.*, 2017). Lors de l'étape de purification, nous avons remarqué que nous perdions du PBP1b dans

la fraction non fixée ainsi que dans les lavages. Afin de stabiliser le complexe, plusieurs concentrations en sel ont été testées et nous avons ainsi baissé la concentration en sel à 200 mM au lieu de 300 mM pour FtsW-PBP3. Ces mises au point ont permis d'isoler le complexe FtsW-PBP1b comme le révèle l'analyse des fractions obtenues par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie dans la Fig. IV.2A. La révélation du marquage à l'ampicilline fluorescente de ce même gel confirme la présence du PBP1b et révèle en plus la présence du PBP3 (Fig. IV.2B). Après concentration des fractions contenant le complexe FtsW-PBP1b, l'échantillon obtenu ainsi que les contrôles PBP1b et PBP3 purifiés sont déposés sur gel confirmant la présence du PBP3 avec le complexe FtsW-PBP1b (Fig. IV.2C). Ces résultats démontrent que lors de la co-purification de FtsW et PBP1b, nous éluons aussi le PBP3 natif de la souche d'expression et que ces trois protéines forment un complexe ternaire. Cependant, il est possible que l'on ne soit pas en présence d'un complexe formée par les trois protéines mais de deux sous-populations de complexes HisFtsW-PBP3 et HisFtsW-PBP1b.

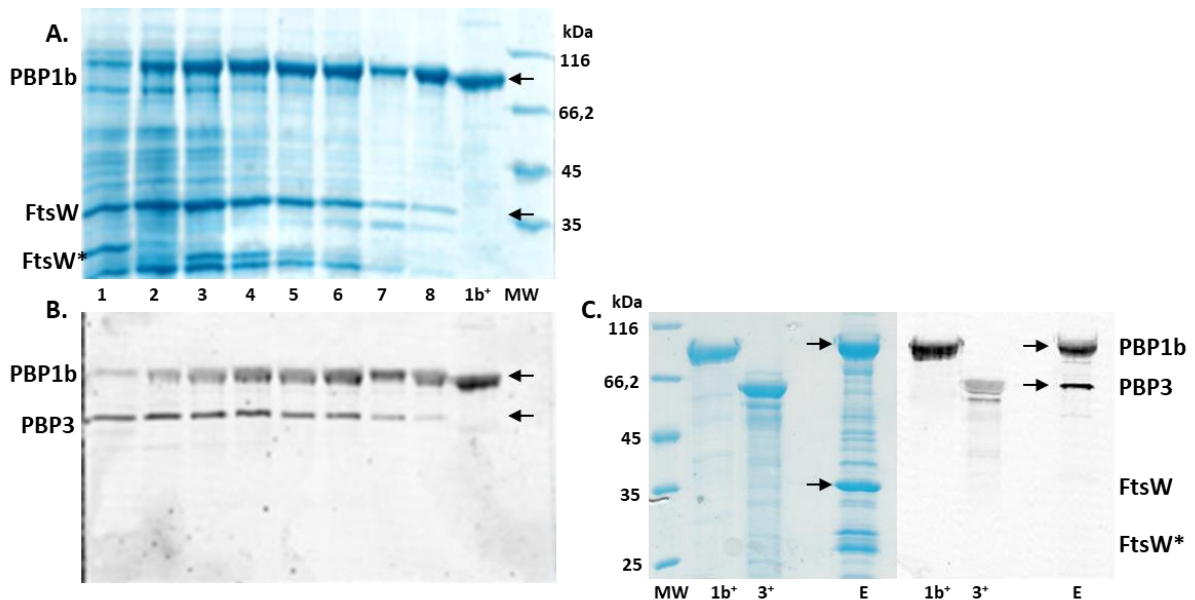


Figure IV.2 : Purification du complexe HisFtsW-PBP1b. Analyse SDS-PAGE sur gel 12% de l'élution du complexe HisFtsW-PBP1b **A.** Coloration au bleu de Coomassie, **B.** Marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. **1 à 8** : Fractions éluées par le gradient d'imidazole. **1b⁺** : PBP1b contrôle. **MW** : marqueur de poids moléculaire. **C.** Analyse SDS-PAGE sur gel 12% du complexe FtsW-PBP1b après concentration, avec PBP1b et PBP3 en contrôles. **MW** : marqueur de poids moléculaire. **1b⁺** : PBP1b contrôle. **3⁺** : PBP3 contrôle. **E** : Fractions d'élution contenant le complexe FtsW-PBP1b regroupées et concentrées, à gauche coloration au bleu de Coomassie, à droite marquage à l'ampicilline fluorescente

Dans le cas du complexe PBP1b-PBP3 (pCIP1082) après purification, seul le PBP3 qui porte l'étiquette histidine est retrouvé dans l'élution, quel que soit le détergent utilisé lors des étapes de solubilisation et de purification (Fig. IV.3A). Ces résultats montrent que le complexe PBP1b-PBP3 est un complexe de plus faible affinité que les complexes FtsW-PBP3 et FtsW-PBP1b. Ceci en corrélation avec les résultats précédents montrant une co-immunoprécipitation des PBP1b et PBP3 après utilisation d'agents pontant (Bertsche *et al.*, 2006).

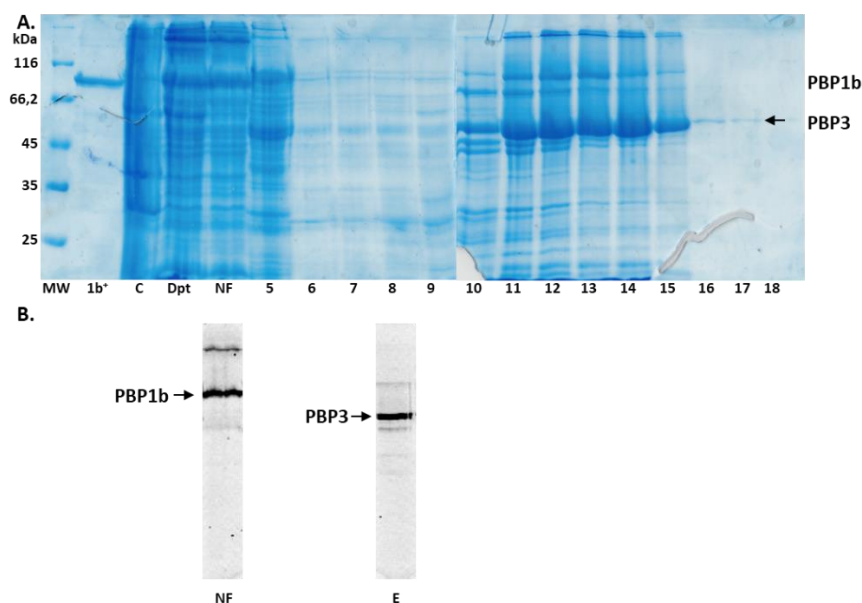


Figure IV.3 : Purification du complexe HisPBP3-PBP1b. Analyse SDS-PAGE sur gel 12% de l'élution du complexe HisPBP3-PBP1b **A.** Coloration au bleu de Coomassie, **B.** Marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. **5 à 18** : Fractions de purification éluées par le gradient d'imidazole. **1b⁺** : PBP1b contrôle. **C** : culot. **Dpt** : échantillon de départ. **NF** : non-fixé. **MW** : marqueur de poids moléculaire. **E** : élution.

De plus, comme le montre la révélation du marquage à l'ampicilline fluorescente le PBP1b se retrouve dans la fraction non-fixée. Il n'y a donc pas d'interaction aspécifique entre PBP1b et la matrice de la colonne (Fig. IV.3B). Ceci montre que le PBP1b est bien exprimé mais aussi que lors de l'élution du complexe FtsW-PBP1b les protéines FtsW et PBP1b interagissent de manière spécifique.

1.1.3. Production et purification du complexe FtsW-PBP3-PBP1b.

Dans le but d'isoler un complexe formé par nos quatre protéines d'intérêt FtsW, PBP1b, PBP3 et FtsN, ces dernières ont été co-exprimées. Nous avons donc transformé des cellules *E. coli* C43 (DE3) successivement par le pDML2040 codant pour FtsW et PBP3 et puis par le pDML2045 codant pour FtsN et PBP1b. Après purification grâce à l'étiquette histidine du PBP3, l'analyse sur gel des fractions d'élution montre la présence de trois protéines : PBP3, FtsW et PBP1b (Fig. IV.4). La présence de ces PBPs est confirmée par le marquage à l'ampicilline fluorescente (Fig. IV.4 à droite). Ce résultat confirme l'existence d'un complexe ternaire puisque PBP1b n'a pas d'affinité pour la matrice, ne forme pas de complexe stable avec le PBP3 et qu'elle ne s'élue qu'en présence de FtsW. Ce résultat indique que le FtsW interagit simultanément avec PBP3 et PBP1b pour former un complexe ternaire.

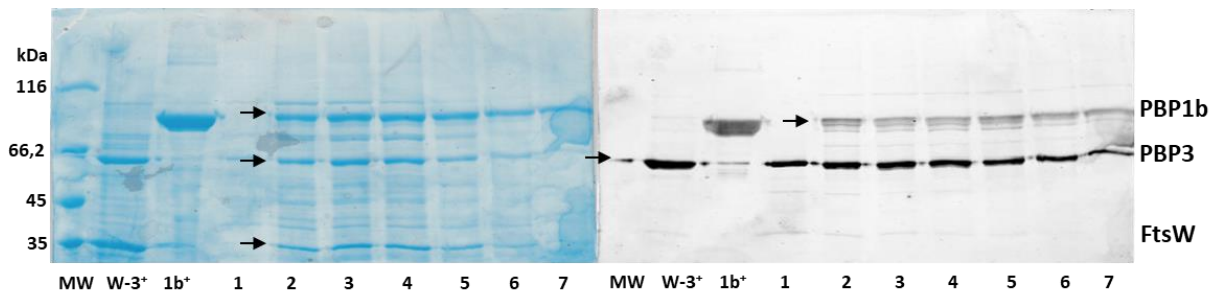


Figure IV.4 : Purification du complexe HisPBP3-FtsW-PBP1b. Analyse SDS-PAGE sur gel 12% de l'élué du complexe HisPBP3-FtsW-PBP1b. **A gauche :** Après coloration au bleu de Coomassie. **A droite :** Après marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. **1 à 7 :** Fractions de purification éluées par le gradient d'imidazole. **1b⁺ :** PBP1b contrôle. **W-3⁺ :** complexe FtsW-PBP3 contrôle. **MW :** marqueur de poids moléculaire.

Bien que le pDML2045 code pour la protéine FtsN de 35 kDa, celle-ci n'est pas co-éluée avec les autres, suggérant que son interaction avec le complexe ternaire est faible. Par ailleurs, nous avons essayé d'obtenir des complexes deux à deux entre FtsN et les trois autres protéines mais sans succès (Tableau IV.1, p.95).

1.2. Rôle de la boucle 7/8 de FtsW dans son interaction avec PBP3

Des études de mutagenèse ont révélé que la large boucle 7/8 de FtsW était importante pour son fonctionnement mais son rôle exact n'a pas été déterminé (Pastoret *et al.*, 2004). Le segment transmembranaire N-terminal de PBP3 est essentiel pour sa localisation et son interaction avec les segments transmembranaires de FtsW (Piette *et al.*, 2004; Wissel *et al.*, 2005; Ovchinnikov *et al.*, 2015). Il a aussi été démontré que la boucle 9/10 de FtsW interagissait avec PBP3 et PBP1b (Fraipont *et al.*, 2011).

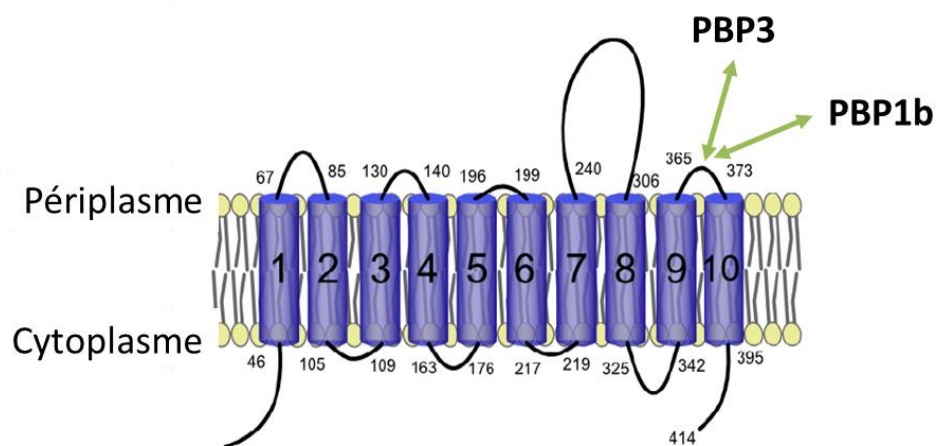


Figure IV.5 : Schéma des interactions de PBP1b et PBP3 avec FtsW (Pastoret *et al.*, 2004).

Lors de mon mémoire, nous avons co-exprimé His-PBP3 et FtsW porteur de l'épitope HA entre les résidus E293 et A294 de sa boucle 7/8 (pDML2043) (Leclercq, 2013). Cette insertion conduit à une protéine FtsW_{HA} fonctionnelle capable de compléter *in vivo* la souche avec FtsW^{ts} (Pastoret *et al.*, 2004). Cependant, les fractions issues de la purification du complexe HisPBP3-FtsW_{HA} contiennent uniquement du PBP3 (Fig. IV.6A et B). L'analyse par western-blot

de la fraction non-fixée avec des anticorps dirigés contre l'épitope HA montre la bonne expression de FtsW_{HA} (Fig. IV.6B). On peut conclure que les 9 résidus de l'épitope HA semblent perturber l'interaction entre PBP3 et FtsW ce qui démontre l'importance de la boucle 7/8 dans cette interaction. Ces résultats sont concordants avec ceux d'études précédentes qui suggèrent que d'autres régions que la boucle 9/10 de FtsW sont impliquées dans l'interaction avec PBP3 (comme un segment transmembranaire ou une région de la boucle 7/8. En effet, le double mutant (P368A, P375A) de la boucle 9/10 de FtsW n'est plus capable de recruter le PBP3 au site de division cependant il est toujours capable d'interagir avec le PBP3 dans le système double-hybride (Pastoret *et al.*, 2004). De plus, chez *M. tuberculosis*, l'interaction PBP3-FtsW dépend des boucles 7/8 et 9/10 de FtsW (Datta *et al.*, 2006).

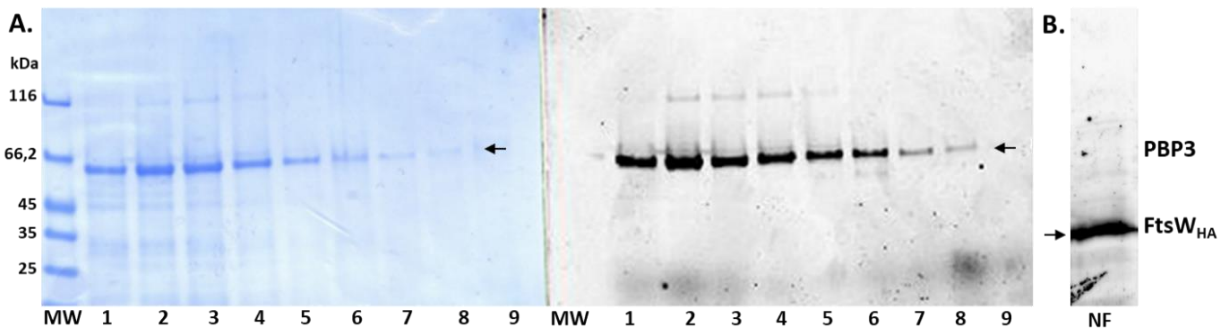


Figure IV.6 : Purification du complexe HisPBP3-FtsW_{HA}. Analyse SDS-PAGE sur gel 12% de l'élué du complexe HisPBP3-FtsW_{HA}. **A gauche :** Après coloration au bleu de Coomassie. **A droite :** Après marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. **1 à 9 :** Fractions de purification éluées par le gradient d'imidazole. **MW :** marqueur de poids moléculaire. **B.** Western-blot sur la fraction non fixée (**NF**) avec des anticorps dirigés contre l'épitope HA.

Dès lors que les interactions au sein des complexes PBP3-PBP1b et PBP3-FtsW_{HA} sont de trop faible affinité pour être obtenus par notre méthode de co-purification, l'interaction simultanée entre PBP3, PBP1b et FtsW_{HA} ne pourrait-elle pas compenser ce manque d'affinité ? Pour vérifier cette hypothèse, les protéines FtsW_{HA} et PBP1b ont été co-exprimées (via le pCIP1083) (Fig. IV.7). La queue poly histidine est portée par FtsW_{HA} et le PBP1b est sous sa forme native. Après purification, les fractions déposées sur gel montrent la présence de deux bandes s'éluant simultanément et correspondant aux PBP1b et FtsW_{HA} (Fig. IV.7 à gauche).

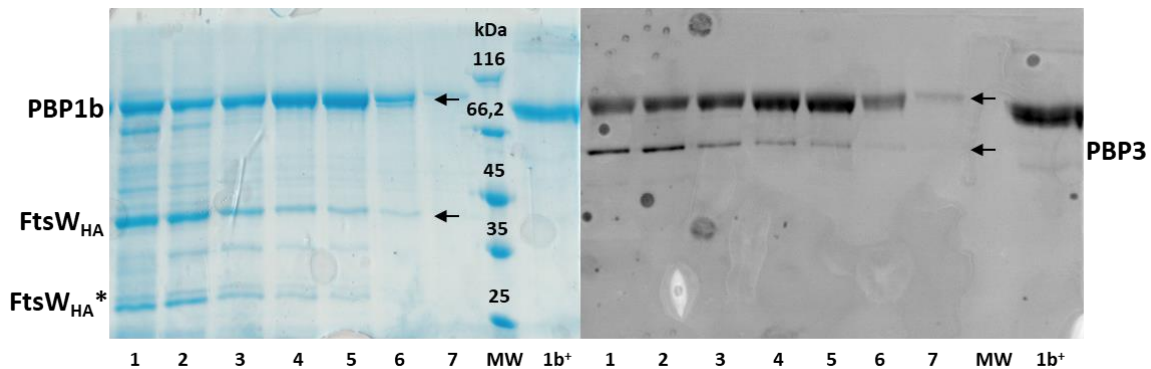


Figure IV.7 : Purification du complexe HisFtsW_{HA}-PBP1b. Analyse SDS-PAGE sur gel 12% de l'élué du complexe HisFtsW_{HA}-PBP1b. **A gauche :** Après coloration au bleu de Coomassie. **A droite :** Après marquage des PBPs à l'ampicilline fluorescente. **1 à 7 :** Fractions de purification éluées par le gradient d'imidazole. **MW :** marqueur de poids moléculaire. **1b⁺ :** PBP1b contrôle.

Ce résultat montre que contrairement au PBP3 l'interaction du PBP1b avec FtsW n'est pas affecté par l'insertion de l'épitope dans la boucle 7/8 (Fig. IV.8). De plus, comme attendu, le test de liaison à l'ampicilline fluorescente révèle la co-élution du PBP3 natif de la souche d'expression (Fig. IV.7 droite). Ce résultat confirme que les protéines FtsW, PBP3 et PBP1b forment un complexe ternaire. C'est la première fois qu'un complexe entre ces protéines est isolé ce qui suppose que leurs activités lors de la division cellulaire sont coordonnées pour synthétiser le peptidoglycane septal.

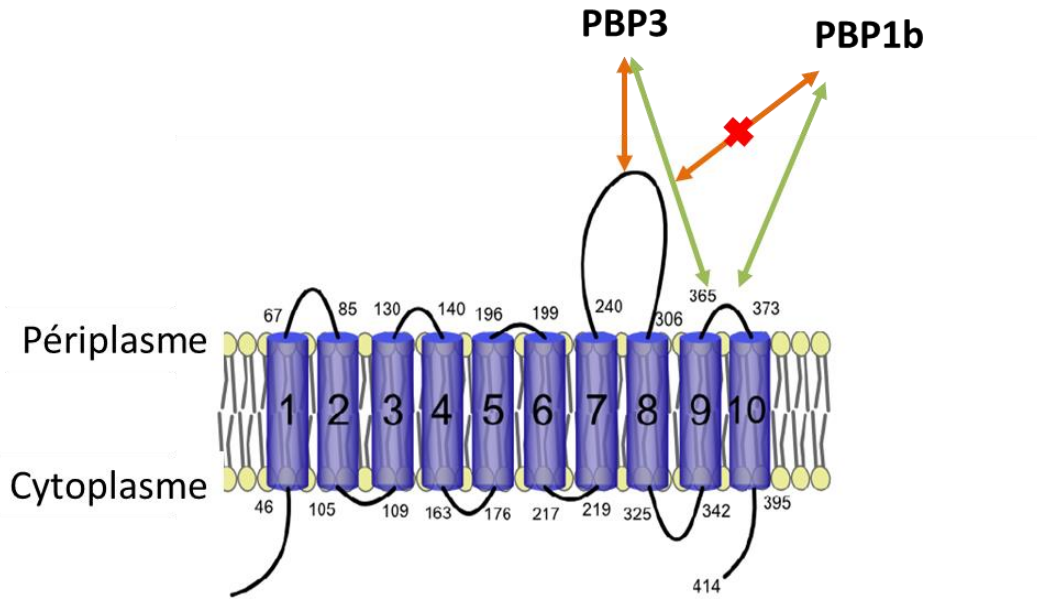


Figure IV.8 : Schéma des interactions de PBP1b et PBP3 avec la boucle 7/8 de FtsW. **Vert :** interactions mises en évidence par Pastoret *et al.*, 2014. **Orange :** résultats obtenus sur les interactions entre PBP3 et PBP1b avec la boucle 7/8 de FtsW.

1.2.1. Résumé des résultats de co-expression

Plasmides	Description	Resultats
pDML2040	pETDuet1-His- <i>ftsI-ftsW</i>	HisPBP3-FtsW
pDML2041	pETDuet1-His- <i>ftsW-ftsI</i>	HisFtsW-PBP3
pDML2043	pETDuet1-His- <i>ftsI-ftsWHA</i>	HisPBP3
pDML2045	pACYCDuet- <i>ponb-ftsN.Stag</i>	/
pDML2040+ 2045	pETDuet1-His- <i>ftsI-ftsW</i> pACYCDuet- <i>ponb-ftsN.Stag</i>	HisPBP3-FtsW-PBP1b
pCIP1000	pETDuet1-His- <i>ftsW-ponb</i>	HisFtsW-PBP1b-(PBP3)
pCIP1001	pETDuet1-His- <i>ftsW-ftsN</i>	HisFtsW
pCIP1081	pETDuet1-His- <i>ftsI-ftsN</i>	HisPBP3
pCIP1082	pETDuet1-His- <i>ftsI-ponb</i>	HisPBP3
pCIP1083	pETDuet1-His- <i>ftsWHA-ponb</i>	HisFtsWHA-PBP1b-(PBP3)

Tableau IV.1 : Résumé des résultats de co-expression. A gauche, les noms des plasmides d'expression. Au centre type de plasmide, protéines exprimées et étiquettes ajoutées pour la purification. A droite, protéines ou complexes isolés après purification.

1.3. **Activité et régulation de la synthèse du peptidoglycane.**

FtsW, PBP3 et PBP1b forment donc un complexe qui se trouve être le noyau enzymatique du divisome. Il reste à comprendre l'effet de ces interactions entre protéines sur la polymérisation du lipide II en peptidoglycane. Dans ce but, nous avons analysé l'activité du PBP1b *in vitro* en présence de FtsW ou PBP3 ou du complexe FtsW-PBP3. L'activité glycosyltransférase de PBP1b d'*E. coli* peut être suivie par fluorescence continue grâce à l'utilisation d'un substrat fluorescent, le dansyle-lipide II. Dans ce test, une fluorescence relative de 100 % reste inchangée au cours du temps pour le dansyle-lipide II seul alors qu'en présence de PBP1b, la fluorescence diminue au cours du temps, au fur et à mesure que le lipide II est polymérisé (Fig. IV.9 et IV.10) (voir 2.16 du MetM) (Schwartz *et al.*, 2002; Egan and Vollmer, 2016). Dans un premier temps, l'activité du PBP1b a été mesurée en présence de différentes concentrations de FtsW provenant d'*E. coli*, de *K. pneumoniae* ou encore de *S. enterica* (Fig. IV.9A). On remarque une inhibition de l'activité glycosyltransférase du PBP1b concentration-dépendante, en présence de FtsW (Fig. IV.9A).

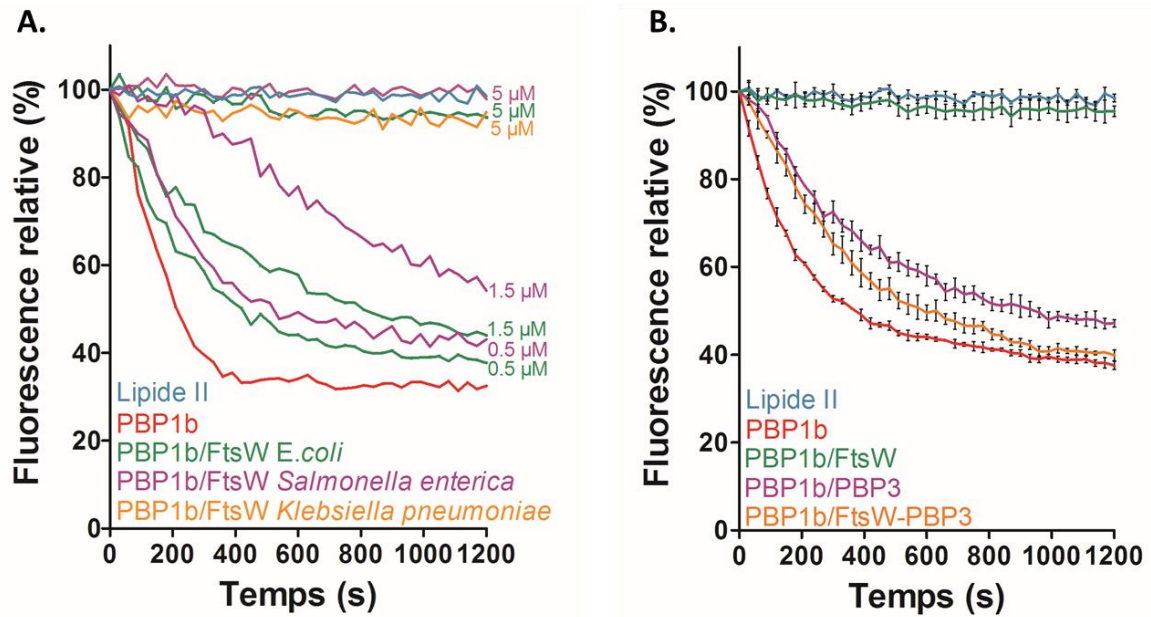


Figure IV.9 : Effet de FtsW, PBP3 et du complexe FtsW-PBP3 sur l'activité du PBP1b. L'activité du PBP1b est accompagnée d'une diminution de fluorescence due à la consommation du substrat fluorescent, le dansyle-lipide II. **A.** inhibition de l'activité du PBP1b par les FtsW provenant de *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *S. enterica*. **B.** En présence du complexe FtsW-PBP3, il n'y a pas d'inhibition de l'activité du PBP1b. Il y a une légère diminution de l'activité du PBP1b en présence du PBP3 (moyenne \pm écart-type, n=3). La signification statistique a été analysée par une Anova one-way complétée d'un test de Tukey permettant la comparaison de l'ensemble des conditions entre elles au cours du temps (voir détails en annexe D). Ainsi on peut constater à 1200 S, une p-value non significative (NS) entre le lipide II et PBP1b/FtsW et entre PBP1b et PBP1b/FtsW-PBP3. Par contre, on observe une p-value <0.0001 (***) entre PBP1b/FtsW et PBP1b/FtsW-PBP3.

Dans un second temps, on a regardé l'effet du complexe FtsW-PBP3 sur l'activité du PBP1b (Fig. IV.9B). Contrairement à l'inhibition observée en présence de FtsW (5 µM), cette inhibition est levée en présence du complexe FtsW-PBP3 (5 µM). L'activité de PBP1b se trouve restaurée à un niveau proche de celui du PBP1b seul (Fig. IV.9B). Enfin, en présence du PBP3 (5µM) seul, on remarque une légère baisse d'activité du PBP1b. La lipoprotéine LpoB interagit avec PBP1b et stimule son activité (Egan *et al.*, 2014). Afin de déterminer si l'activation du PBP1b par LpoB pouvait lever l'inhibition par FtsW sur la polymérisation du lipide II, nous avons à nouveau réalisé l'expérience en présence de LpoB. Comme attendu, LpoB (200 nM) seul stimule l'activité glycosyltransférase du PBP1b ce qui se reflète par une diminution supplémentaire de fluorescence en sa présence (Fig. IV.10). Néanmoins, même en présence de LpoB, FtsW continue d'inhiber l'activité du PBP1b (Fig. IV.10).

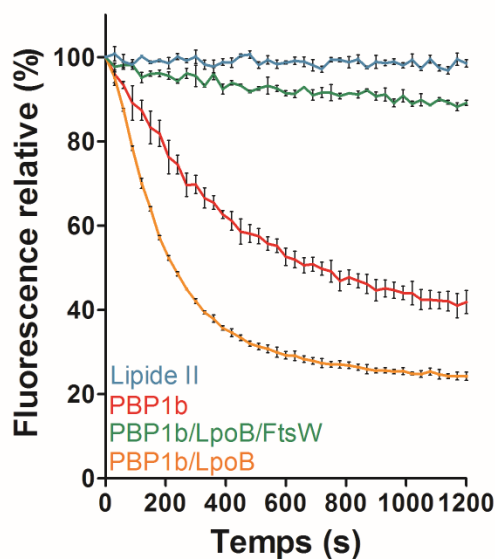


Figure IV.10. Effet de FtsW sur l'activité du PBP1b stimulé par LpoB. L'activité de synthèse du PBP1b est accompagnée d'une diminution de fluorescence due à la consommation du substrat fluorescent, le dansyle-lipide II. Celle-ci est renforcée en présence de l'activateur du PBP1b, LpoB. L'activation de PBP1b par LpoB (200 nM) ne supprime pas l'inhibition par FtsW (5 μ M) (moyenne \pm écart-type, n=3). La signification statistique a été analysée par une Anova one-way complétée d'un test de Tukey permettant la comparaison de l'ensemble des conditions entre elles au cours du temps (voir détails en annexe D). Ainsi on peut constater à 1200 S, une p-value >0.01 (*) entre le lipide II et PBP1b/LpoB/FtsW. En revanche, on observe une p-value <0.0001 (***) entre PBP1b/LpoB/FtsW et PBP1b/LpoB.

Chez les PBPs de classe A comme PBP1b, l'activité glycosyltransférase est couplée à l'activité transpeptidase (TPase)(Bertsche *et al.*, 2005). Et dans certaines conditions, le domaine de liaison à la pénicilline est capable d'avoir une activité carboxypeptidase (CPase) (Egan *et al.*, 2015). Nous avons alors testé si l'inhibition de l'activité glycosyltransférase par FtsW conduisait à une diminution concomitante de l'activité TPase et CPase en analysant par HPLC la composition du peptidoglycane produit (en collaboration avec W. Vollmer à l'université de Newcastle, Royaume Uni). Nous avons incubé du lipide II radioactif avec la PBP1b ou PBP1b-LpoB en présence ou en absence de FtsW ou de FtsW-PBP3. Le peptidoglycane a été digéré avec la muramidase et les mucopeptides résultants ont été réduits par du borohydrure de sodium et séparés par HPLC. Nous constatons que l'activité totale du domaine transpeptidase (TPase et CPase) de PBP1b se trouve réduite de manière concentration-dépendante par FtsW (Fig. IV.11). De plus, comme observé pour l'activité glycosyltransférase cette inhibition se trouve levée en présence du complexe FtsW-PBP3 (Fig. IV.11). La même tendance est observée pour le peptidoglycane produit par PBP1b stimulé par LpoB. (Fig. IV.11).

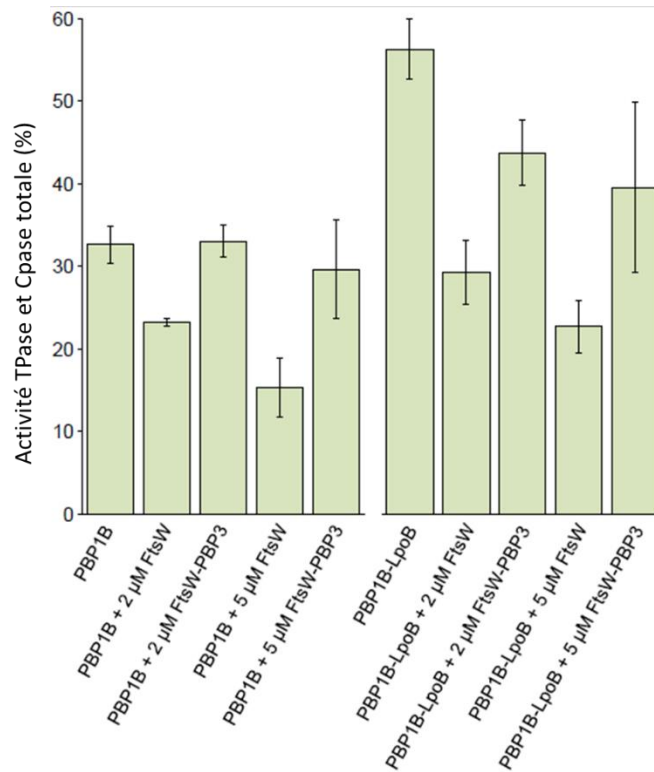


Figure IV.11 : Effet de FtsW et du complexe FtsW-PBP3 sur l'activité transpeptidase du PBP1b. Pourcentages de mucopeptides détectés par HPLC, issus du peptidoglycane produit *in vitro* par PBP1b, en présence de LpoB, FtsW ou du complexe FtsW-PBP3. L'activité totale du domaine transpeptidase de PBP1b comprend le pourcentage de peptides pontés et le pourcentage de produit issu de l'activité carboxypeptidase. Les valeurs reprises sont la moyenne \pm écarts-types issue de trois expériences différentes. Des exemples des chromatogrammes HPLC correspondant au graphique ci-dessus sont présentés en annexe E.

L'inhibition de l'activité du PBP1b par FtsW est le résultat soit d'une interaction directe avec le PBP1b, soit avec le lipide II, FtsW interagissant potentiellement avec les deux. Pour approfondir ces résultats, nous avons réalisé une analyse par SDS-PAGE du peptidoglycane résultant de la polymérisation du Lipide II radioactif (Fig. IV.12). L'avantage de cette technique est de permettre une visualisation du lipide II non utilisé et des différentes tailles de chaînes de glycane. Afin de visualiser ces dernières nous avons utilisé un PBP1b* dont le site actif transpeptidase a été inactivé par introduction de la mutation S510A.

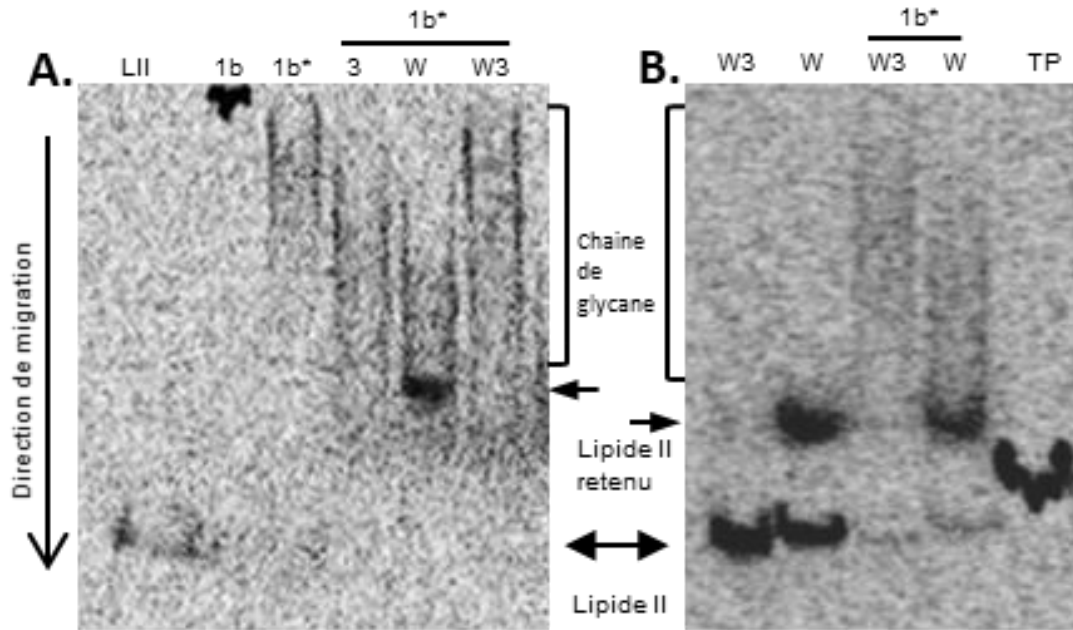


Figure IV.12 : Effet de FtsW, du PBP3 et du complexe FtsW-PBP3 sur la mobilité du lipide II et sur sa polymérisation par le PBP1b. Le gel SDS-PAGE dans lequel le lipide II radioactif a migré est déposé contre un écran phosphore et celui-ci est révélé à l'aide du Typhoon trio +. **A.** Analyse SDS-PAGE du peptidoglycane produit par PBP1b ou PBP1b* (100nM) en présence ou en absence de FtsW (W), PBP3 (3) ou du complexe FtsW-PBP3 (W3) (3µM). **B.** Analyse SDS-PAGE de la mobilité du lipide II en présence de FtsW ou du complexe FtsW-PBP3 (3µM). Le tampon d'extraction (4% de DDM) (TP) est utilisé comme contrôle.

Le lipide II seul migre vers le front de migration. Lorsque PBP1b* (100 nM) est ajoutée, le lipide II est polymérisé en chaînes de glycanes qui migrent dans le gel selon leur taille. Lorsqu'il y a une transpeptidation, les chaînes pontées restent dans le puits (Fig. IV.12A). L'activité du PBP1b* est partiellement inhibée par l'ajout de FtsW (3 µM) et la longueur des chaînes de glycanes se trouve réduite. De plus, nous pouvons voir que la migration du lipide II dans le gel est modifiée en présence de FtsW. Cependant, en présence du complexe FtsW-PBP3 (3 µM), il n'y a pas d'inhibition de l'activité du PBP1b* ou de modification au niveau de la migration du lipide II (Fig. IV.12A et B). De la même façon, en absence de PBP1b ou PBP1b*, l'ajout de FtsW au lipide II réduit la mobilité de celui-ci dans le gel alors que lors de l'ajout du complexe FtsW-PBP3 il se retrouve au niveau du front de migration (Fig. IV.12B). Le retard de migration du lipide II en présence de FtsW suggère une interaction directe entre le substrat et la protéine (Fig. IV.12A et B). En présence de PBP3, nous remarquons un léger raccourcissement de la longueur des chaînes de glycane (Fig. IV.12A).

1.4. Interaction entre FtsW et le lipide II et régulation par PBP3

L'inhibition de l'activité de PBP1b par FtsW serait potentiellement due à une interaction directe entre FtsW et le lipide II. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons incubé du lipide II fluorescent (NBD-lipide II) avec FtsW avant de le déposer sur gel, d'abord dans des conditions où le SDS est retiré du bleu de chargement. On révèle en premier lieu, la fluorescence du lipide II à l'aide du Typhoon trio+ et le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (Voir 2.14.3 du

MetM). Comme postulé, la comparaison des deux révélations montre une co-migration du lipide II avec FtsW (Fig. IV.13A).

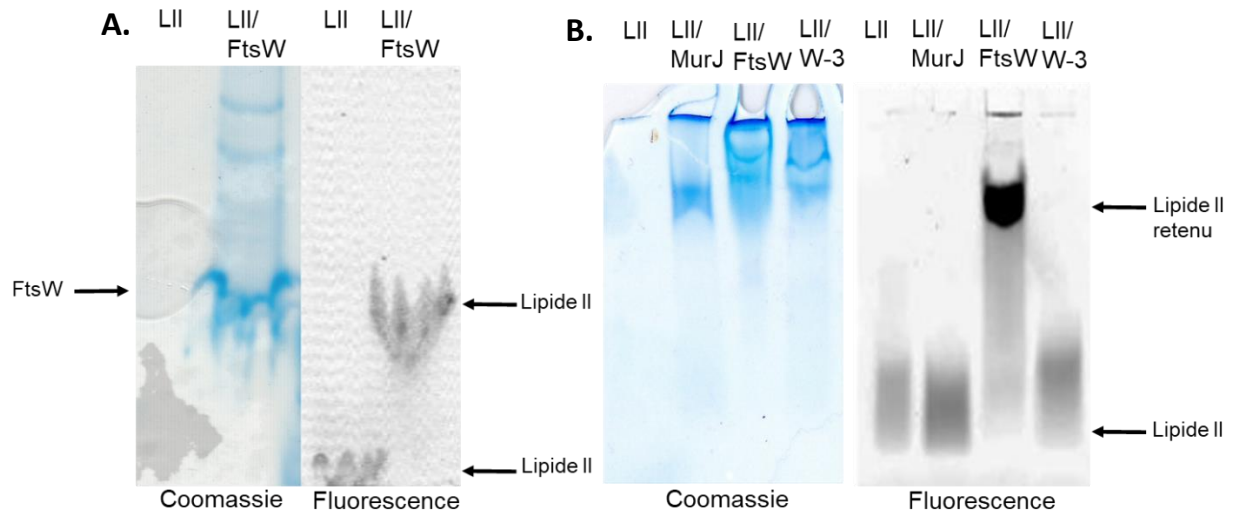


Figure IV.13 : Mise en évidence de la co-migration du lipide II avec FtsW. A. Migration du lipide II fluorescent (NBD-lipide II) en présence et en absence de FtsW (5 μ M) en condition « semi-native », le gel contenant du SDS mais pas le bleu de chargement. B. Migration du lipide II fluorescent en condition native en présence ou en absence de FtsW, MurJ ou du complexe FtsW-PBP3 (chacun à 5 μ M).

Nous avons ensuite refait la même expérience en condition native et la mobilité du lipide II pré-incubé avec FtsW se trouve à nouveau affectée (Fig. IV.13B). Fait intéressant, le lipide II n'est pas retenu en présence du complexe FtsW-PBP3 ou de MurJ, l'autre protéine candidate pour l'activité flippase (Fig. IV.13B). L'interaction entre FtsW et le lipide II est donc spécifique. De plus, ces résultats sont en corrélation avec certaines observations *in vivo*. En effet, lors de la surproduction de FtsW les cellules cessent de croître à une $DO_{600nm} \pm 1,5$, alors que les cellules exprimant le vecteur sans insert dépassent les 2,5 de DO_{600nm} . Néanmoins lors de la surproduction de FtsW-PBP3, nous observons une DO_{600nm} proche de celle des cellules exprimant le vecteur sans insert (Fig. IV.14). Nous en déduisons que la surexpression de FtsW pourrait entraîner une séquestration du lipide II qui serait alors indisponible pour la croissance cellulaire. Par contre lors de la surexpression de FtsW et PBP3, l'interaction de FtsW avec le lipide II se trouve régulé par PBP3 et il n'y a donc pas d'impact sur la croissance cellulaire (Fig. IV.14).

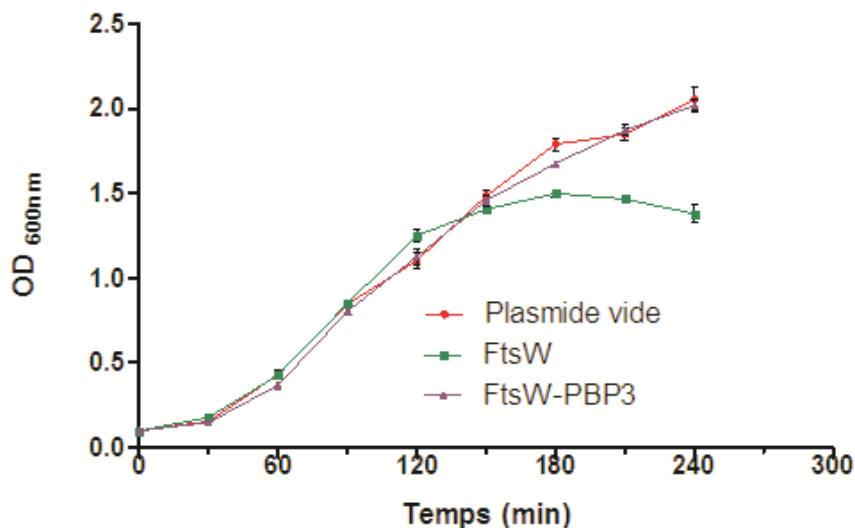


Figure IV.14 : Courbe de croissance des cellules *E. coli* C43 (DE3) exprimant FtsW ou le complexe FtsW-PBP3. La souche *E. coli* C43 a été transformée par le plasmide pET-Duet sans insert, ou le plasmide pET-Duet contenant le gène *ftsW* ou les deux gènes *ftsW* et *ftsI*. Les cellules ont été cultivées dans du milieu LB à 37°C et la DO_{600nm} des cultures cellulaires a été suivie au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'inhibition exercée par FtsW sur l'activité de polymérisation du lipide II par PBP1b est due à l'interaction directe entre le lipide II et FtsW. De plus, l'interaction de FtsW avec PBP3 semble moduler l'interaction entre la flippase/GTase potentielle et son substrat, le lipide II.

1.5. **Activité glycosyltransférase des protéines SEDS.**

De récents résultats accordent une activité glycosyltransférase aux protéines de la famille SEDS. (Meeske, Riley, *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2016; Sjodt *et al.*, 2018; Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018). Bien que nous ayons démontré une interaction entre le lipide II et la protéine SEDS FtsW d'*E. coli*, celle-ci ainsi que ses deux orthologues (FtsW de *K. pneumoniae* et *S. enterica*) semblent incapables de polymériser le lipide II en chaînes de glycane *in vitro* (Fig. IV.12B et IV.15A). Après incubation du lipide II radioactif avec FtsW provenant de *K. pneumoniae* ou *S. enterica*, le mélange est déposé sur une plaque TLC. Le lipide II seul migre avec la phase mobile et sous l'effet de l'activité de la PBP1b, le lipide II est polymérisé en peptidoglycane qui lui ne migre pas (Fig. IV.15A). Comme nous le constatons, seul le lipide II est visible dans le cas de FtsWKp et FtsWSe (Fig. IV.15A). De même, lors de l'analyse par HPLC des muuropeptides résultants de la digestion du produit de la réaction du lipide II avec FtsW ou FtsW-PBP3 d'*E. coli*, nous n'observons aucun produit de polymérisation du lipide II et seul le disaccharide pentapeptide du lipide II est visible sur le chromatogramme (Fig. IV.15B). En effet, la polymérisation des chaînes de glycane entraîne une diminution du disaccharide monophosphorylé pentapeptide au profit d'autres produits correspondant à un peptidoglycane polymérisé et ponté (Fig. IV.15B).

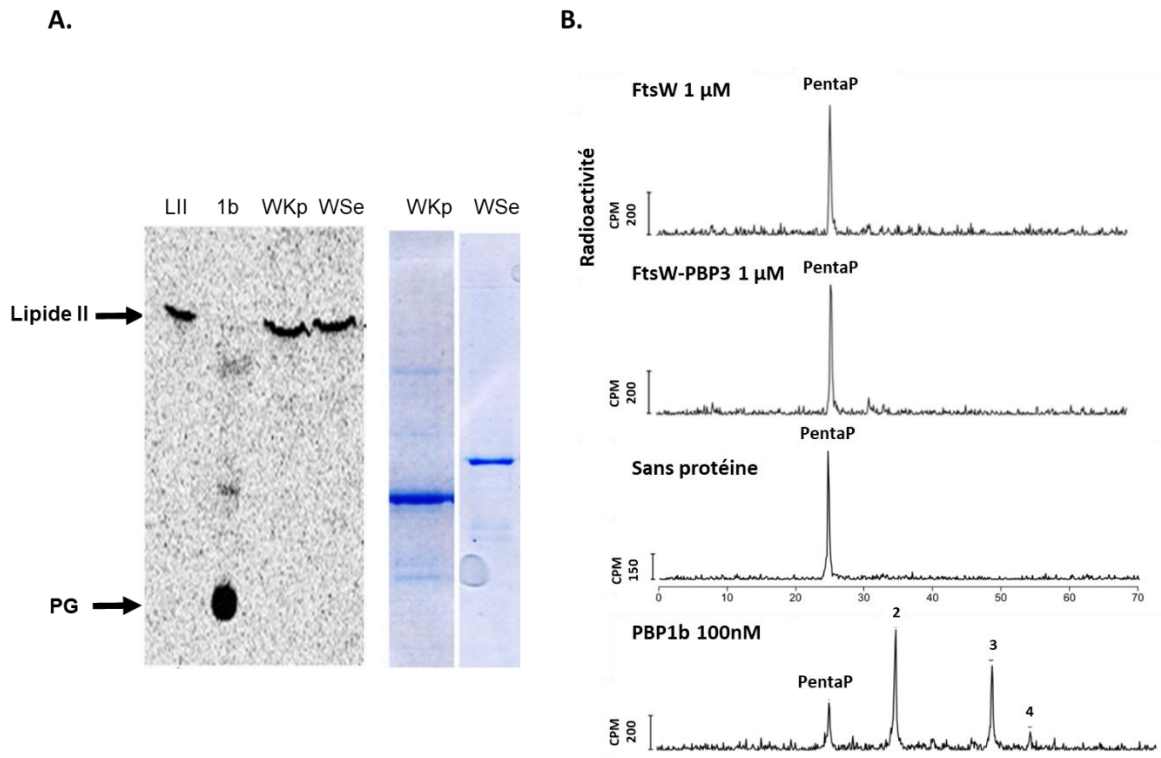


Figure IV.15 : Analyse de l'activité glycosyltransférase des protéines SEDS. **A.** A gauche : TLC effectuée à partir de lipide II radioactif incubé avec FtsWKp ou FtsWSe. A droite : analyse SDS-PAGE des protéines FtsWKp et FtsWSe purifiées. **B.** Chromatogrammes HPLC des produits de réaction issus de l'incubation du lipide II avec FtsW, FtsW-PBP3 ou PBP1b ou sans protéine ajoutée. **PentaP** : disaccharide monophosphorylé pentapeptide. **2** : disaccharide pentapeptide. **3** : bis-disaccharide tetratrapeptide. **4** : bis-disaccharide tetrapentapeptide.

1.6. Effet de MurJ sur le lipide II et sa polymérisation par PBP1b.

L'identification de la flippase du lipide II suscite beaucoup de débats (Ruiz, 2015). Chez *E. coli*, les protéines de la famille SEDS (FtsW et RodA) et MurJ ont été proposées comme flippase du lipide II (Mohammadi *et al.*, 2011; Sham *et al.*, 2014; Kuk *et al.*, 2017; Bolla *et al.*, 2018). Nous avons supposé que la protéine responsable de la translocation du lipide II du cytoplasme vers le périplasma devrait interagir avec le lipide II et potentiellement avoir un effet sur l'activité de polymérisation du PBP1b comme observé pour FtsW. Nous avons alors testé l'effet de MurJ sur l'activité glycosyltransférase de la PBP1b de la même manière que pour FtsW (Fig. IV.9A). Lors du test de fluorescence continu, l'ajout de MurJ au dansyle-lipide II en présence du PBP1b, ne montre aucun effet sur l'activité de celle-ci (Fig. IV.16).

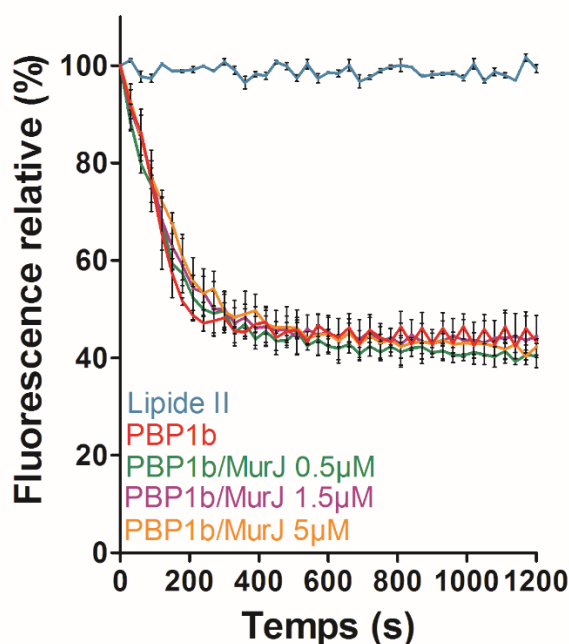


Figure IV.16 : Analyse de l'effet de MurJ sur l'activité de polymérisation du lipide II par la PBP1b. L'activité de synthèse du PBP1b est accompagnée d'une diminution de fluorescence due à la polymérisation du substrat fluorescent, le dansyle-lipide II. Il n'y a pas d'effet de MurJ sur l'activité du PBP1b (moyenne \pm écart-type, $n=3$). La signification statistique a été analysée par une Anova one-way complétée d'un test de Tukey permettant la comparaison de l'ensemble des conditions entre elles au cours du temps (voir détails en annexe D). Ainsi on peut constater à 1200 S, une p-value non significative entre PBP1b et PBP1b/MurJ quelle que soit la concentration de MurJ. Par contre, on observe une p-value <0.0001 (***) entre le lipide II et PBP1b/MurJ quelle que soit la concentration de MurJ.

De plus, nous avons vu que lorsque l'on incube MurJ avec le lipide II et que nous le déposons sur gel en condition native aucune interaction directe n'est observée (Fig. IV.13B). Nos résultats montrent que MurJ n'interagit pas directement avec le lipide II et que si celle-ci est une flippase, elle nécessite peut-être un partenaire supplémentaire ou des conditions particulières pour réaliser la translocation du lipide II (Bolla *et al.*, 2018).

L'ensemble des résultats de ce chapitre font l'objet d'une publication dans Scientific Reports (annexe H).

Leclercq, S., Derouaux, A., Olatunji, S., Fraipont, C., Egan, A.J.F., Vollmer, W., Breukink, E. & Terrak, M., (2017) Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis. *Sci. Rep.*7, 43306.

2. Chapitre 2 : hydrolyse du peptidoglycane septal

Le nouveau peptidoglycane septal synthétisé doit être partagé entre les deux cellules filles. L'amidase AmiC et son régulateur NlpD font partie des protéines impliquées dans ce processus d'hydrolyse. En effet, AmiC possède une activité *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidase spécifiquement activée par le domaine LytM de NlpD (Uehara *et al.*, 2009; de Boer, 2010; Uehara *et al.*, 2010). Le recrutement de ces deux protéines au site de division nécessite la présence de FtsN, créant ainsi un lien entre les protéines de la synthèse et celles impliquées dans l'hydrolyse du peptidoglycane septal (Peters *et al.*, 2011). De plus, l'activité hydrolase des amidases favorise en retour le recrutement de FtsN grâce à l'interaction de son domaine SPOR avec le peptidoglycane dépourvu de peptides (Gerding *et al.*, 2009).

2.1. Etude de la localisation de l'amidase AmiC au site de division, via son domaine AMIN

La structure cristallographique d'AmiC présente deux domaines: un domaine AMIN et un domaine catalytique (Rocaboy *et al.*, 2013). Le domaine AMIN qui lie le peptidoglycane est caractérisé par deux feuillets β superposables comportant des résidus conservés d'un feuillet à l'autre et quatre motifs conservés RXXXD/E, deux par feuillet (Fig. IV.17). Il est responsable de la localisation d'AmiC au site de division probablement via son interaction avec le peptidoglycane (Bernhardt and De Boer, 2003; Rocaboy *et al.*, 2013). Cependant, la manière par laquelle le domaine AMIN interagit avec le peptidoglycane reste indéterminé. Dans le but de mieux comprendre cette interaction et de déterminer les résidus impliqués, nous avons eu recours à la RMN et la mutagenèse dirigée.

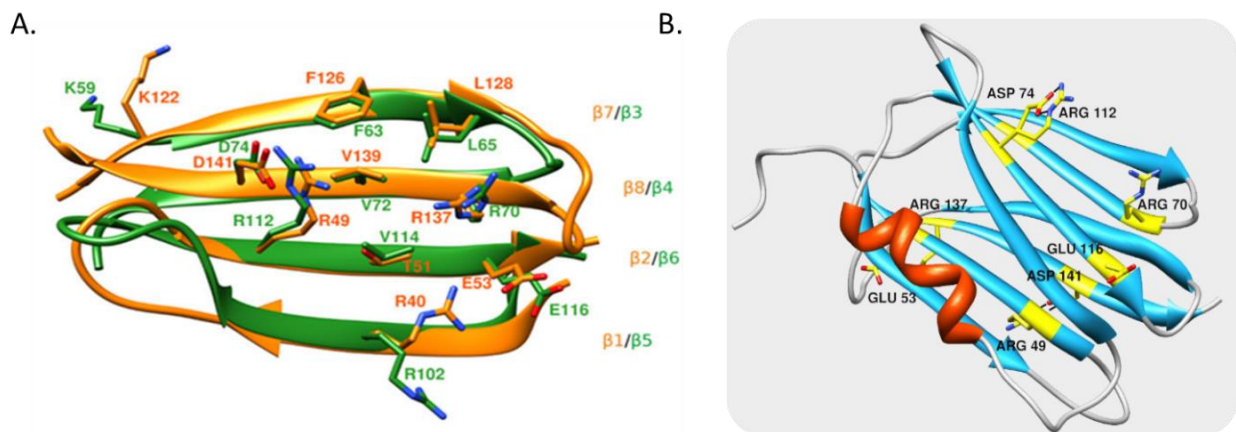


Figure IV.17 : Structure du domaine AMIN d'AmiC. A. Superposition des feuillets β du domaine AMIN faisant apparaître les résidus conservés d'un feuillet à l'autre B. Mise évidence en jaune sur la structure des résidus des quatre motifs RXXXD/E. (Rocaboy *et al.*, 2013)

2.1.1. Etude de l'interaction entre AmiC et le peptidoglycane par RMN

Afin d'étudier par RMN, l'interaction entre AmiC et le peptidoglycane, nous avons produit et purifié le domaine AMIN avec un marquage isotopique uniforme au ^{13}C et/ou ^{15}N . Lors de la mise au point de la production de la protéine en milieu minimum, nous avons fait varier la

température (de 18°C à 37°C) et le temps d'induction (de 2 à 16 heures). Les résultats après purification, présentés en annexe F, montrent que les meilleures conditions d'induction sont 5 heures à 37°C. En tenant compte de ces résultats et des contraintes liées au milieu minimum nous avons opté pour une induction de 3 à 4 heures et une culture à 37°C. Le domaine AMIN pourvu de sa queue poly-histidine a ensuite été purifié sur une résine chargée en nickel et les différentes fractions d'éluion ont été analysées par SDS-PAGE (Fig. IV.18A). Après coloration au bleu de Coomassie, deux bandes apparaissent dans l'éluion, une première à 25 kDa et une seconde à environ 15 kDa correspondant au domaine AMIN. La bande à 25 kDa correspond à une anhydrase carbonique qui peut être surexprimé par *E. coli* pour s'adapter aux conditions du milieu minimum, son identité a été confirmée par spectrométrie de masse (Merlin *et al.*, 2003). Celle-ci étant un métallo-enzyme à zinc, elle possède une affinité naturelle pour la matrice de nickel et s'éluie en même temps que notre protéine (Fig. IV.18A). Les fractions contenant le domaine AMIN sont ensuite incubées avec la protéase TEV afin de cliver l'étiquette histidine (rendement 58%). Après un second passage sur la même colonne, nous récupérons le domaine AMIN dans la fraction non fixée (Fig. IV.18B). Nous éluons ensuite l'anhydrase carbonique et la TEV (qui porte une étiquette histidine) avec un tampon contenant 300 mM d'imidazole. Enfin après passage sur un tamis moléculaire pour éliminer les éventuels agrégats, la protéine est concentrée (Fig. IV.18C).

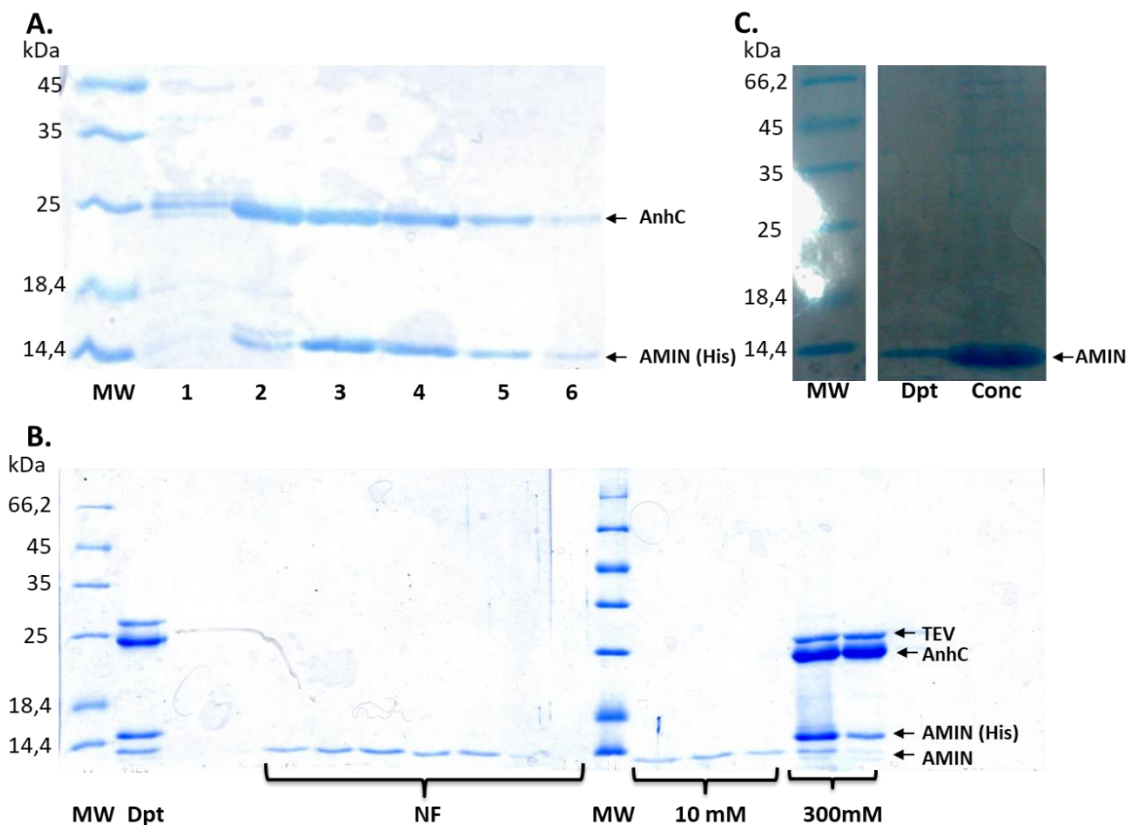


Figure IV.18: Analyse de la purification du domaine AMIN ¹⁵N. A. SDS-PAGE sur gel 15% de l'éluion par palier d'imidazole du domaine AMIN marqué (15 kDa) B. SDS-PAGE sur gel 15% de la purification du domaine AMIN ¹⁵N après clivage de son étiquette histidine par la TEV (27 kDa). C. SDS-PAGE sur gel 15% du domaine AMIN ¹⁵N après passage sur tamis moléculaire et concentration. **MW** : marqueur de poids moléculaire. **Dpt** : échantillon de départ. **NF** : non-fixé. **10 et 300 mM** : concentrations en imidazole. **1 à 6** : fractions d'éluion par le gradient d'imidazole. **Conc** : échantillon concentré.

Une fois purifiée la protéine marquée isotopiquement est envoyée à l'équipe du Dr Jean-Pierre SIMORRE de l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble en France. Dans un premier temps, l'équipe du Dr Jean-Pierre SIMORRE a procédé à l'enregistrement de spectres RMN 2D et 3D hétéronucléaires pour permettre l'attribution de l'ensemble des fréquences de résonance des noyaux de la chaîne principale et des chaînes latérales du domaine AMIN. Dans un second temps, elle a réalisé l'enregistrement de spectres de corrélation 2D $^1\text{H},^{15}\text{N}$ d'échantillons contenant le domaine AMIN ^{15}N et des fragments de peptidoglycane pour pouvoir déterminer le site d'interaction du domaine AMIN avec le peptidoglycane par mesure des perturbations d'intensités ou de déplacements chimiques des résonances ^1H , ^{13}C et ^{15}N de la protéine.

2.1.1.1. Attribution des résonances du domaine AMIN

Le spectre de corrélation $^1\text{H},^{15}\text{N}$ (BEST-TROSY), du domaine AMIN montre des signaux très dispersés correspondant à une protéine parfaitement repliée (Fig. IV.19) (Favier and Brutscher, 2011). Il a servi de base à l'attribution des noyaux du squelette de la protéine. Sur les 114 acides aminés qui composent le domaine AMIN, 101 ont pu être attribués à l'aide d'expériences hétéronucléaires tridimensionnelles (HNCA, HNCO, HNCACB, ...). Seuls les carbones C_α et C_β des 7 prolines ont pu être identifiés car l'azote des prolines n'est lié à aucun hydrogène et donc indétectable dans l'expérience de corrélation $^1\text{H},^{15}\text{N}$. Un pourcentage d'attribution global de 94,73 % des noyaux de la chaîne principale a été obtenu.

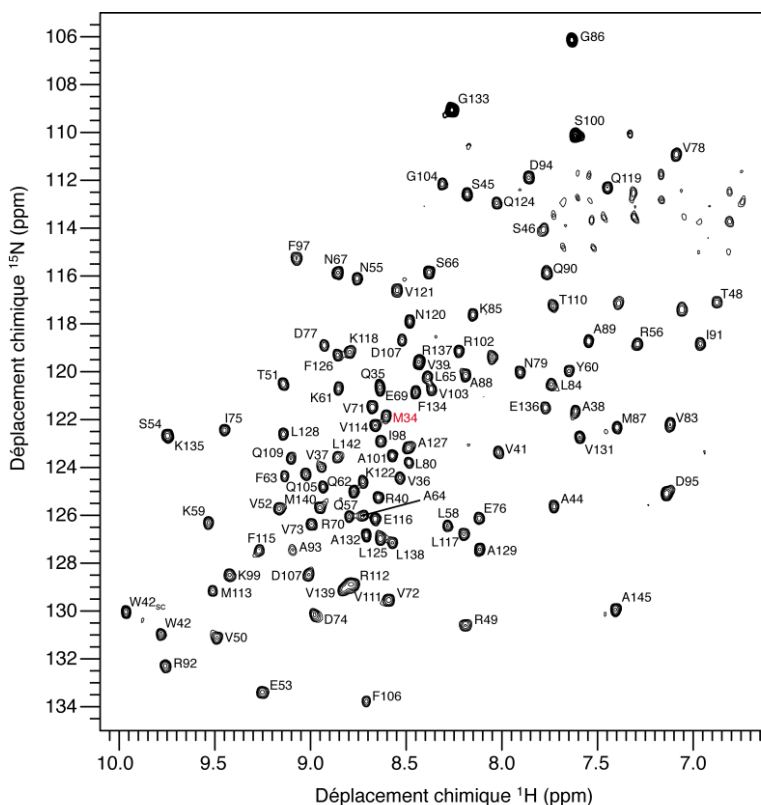


Figure IV.19 : Spectre BEST-TROSY $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC de $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ -AMIN à 293 K dans 20 mM de phosphate de sodium, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01% NaN_3 , 10% D_2O , pH 6,8. Les attributions des corrélations amide sont reportées. W42Sc indique la corrélation de la chaîne latérale du tryptophane correspondant.

L'attribution des chaînes latérales n'étant pas indispensable pour les expériences d'interaction, seuls les carbones beta des chaînes latérales ont été attribués par le biais des expériences de corrélations dites HNCACB, requises pour l'attribution du backbone.

2.1.1.2. Etude de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane

Les études d'interactions protéine-ligand par RMN nécessitent l'enregistrement de spectres 2D de corrélation entre le ^1H et le ^{15}N de la protéine marquée ^{15}N (et éventuellement ^{13}C) en l'absence et en présence du ligand. La technique repose sur le fait qu'au niveau du site d'interaction, l'environnement des atomes change et que cette modification va entraîner des variations de la position et/ou de l'intensité des signaux de corrélation des acides aminés impliqués. La superposition des expériences 2D avant et après ajout du ligand permet donc d'identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction. Le peptidoglycane étant insoluble pour travailler en RMN liquide, celui-ci a été préalablement digéré soit par AmiC qui sépare les peptides des chaînes de glycanes soit par le PBP4 qui hydrolyse les ponts peptidiques entre les chaînes de glycanes (Fig. IV.20).

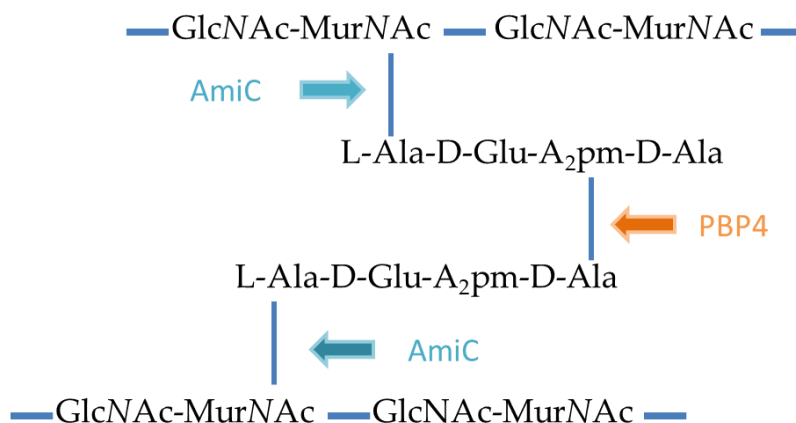


Figure IV.20 : Hydrolyse du peptidoglycane par AmiC et PBP4. La structure et la composition du peptidoglycane sont celles retrouvées chez *E. coli*. AmiC hydrolyse le lien amide entre le groupement lactyl du MurNAc et la L-alanine du peptide. PBP4 clive les liens amides dans le peptide.

Des spectres BEST-TROSY ^1H , ^{15}N ont donc été collectés sur des échantillons contenant le domaine AMIN marqué, en présence de fragments issus de la digestion par AmiC ou par la PBP4. Après traitement des données, deux paramètres sont utilisés pour comparer ces spectres : la variation de déplacement chimique (CSP) et le rapport des intensités ($I/I(\text{ref})$) (Fig. IV.21).

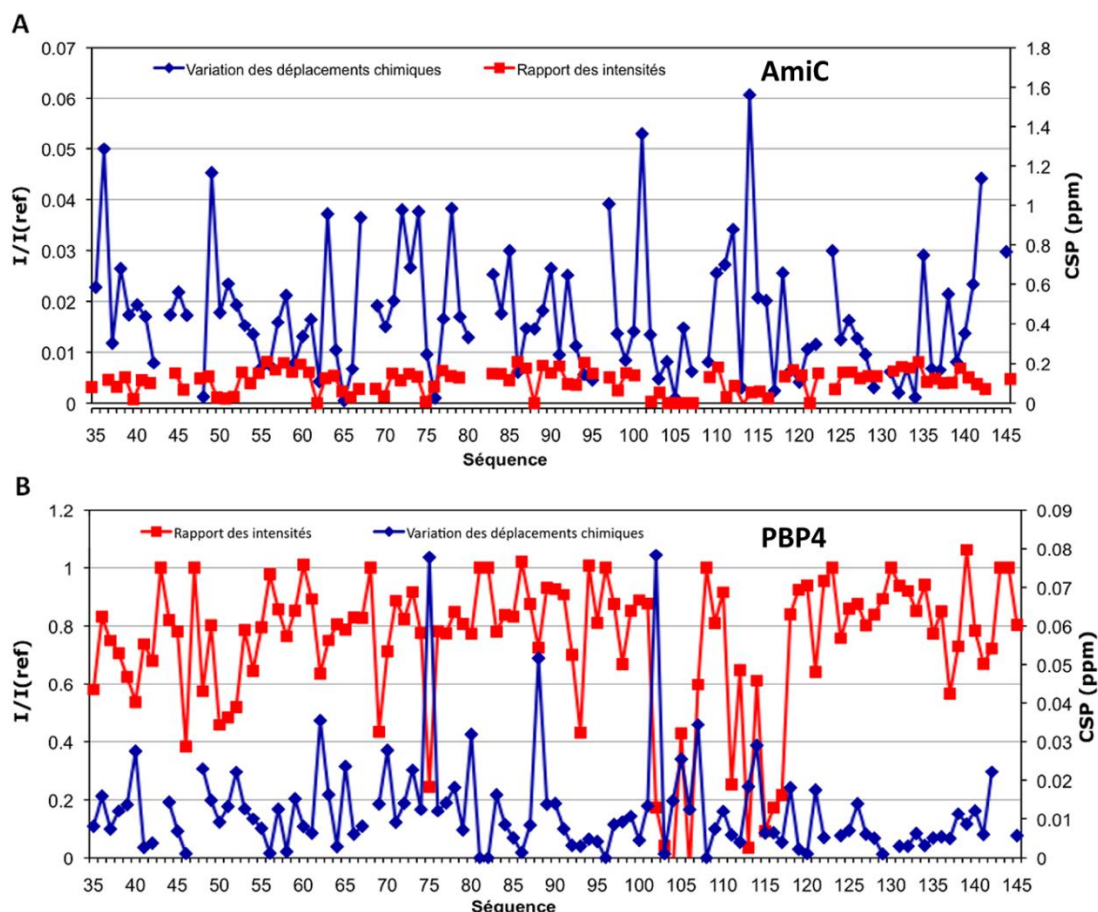


Figure IV.21 : Analyse des variations de déplacement chimique (CSP) ou d'intensité (I/I_{ref}) des résonances amide dans le spectre BEST-TROSY 1H,15N-HSQC du domaine AMIN après l'ajout de fragments de peptidoglycane. **A.** Domaine AMIN avec le peptidoglycane traité par AmiC. **B.** Domaine AMIN avec le peptidoglycane traité par la PBP4.

Dans les deux cas, nous constatons que la présence des fragments de peptidoglycane induit des variations de déplacement chimique et/ou d'intensité significatives sur les résonances de la protéine. Ces résultats indiquent qu'il y a une interaction entre le domaine AMIN et les fragments de peptidoglycane. Néanmoins, pour l'interaction avec le peptidoglycane digéré par AmiC, les variations sont observées sur l'ensemble de la protéine. Ce qui suggère soit une interaction peu spécifique, soit un réarrangement conformationnel de la protéine lors de l'interaction avec le peptidoglycane. Alors que dans le cas des fragments préparés avec la PBP4, les variations se trouvent plus localisées. Ainsi, les résidus I75, A88 et R102 subissent un déplacement chimique au-dessus de 0,05 ppm ce qui est supérieur de deux-écart types à la valeur moyenne sur l'ensemble de la séquence protéique (Fig. IV.21 et IV.22A). Tandis que les résidus I75, R102, V103, G104, F106, V111, M113, F115, E116 et L117 subissent une diminution significative d'intensité ($I/I_{ref} < 0,4$) (Fig. IV.21 et IV.22A). L'ensemble des résidus affectés ont été reportés sur la structure cristallographique du domaine AMIN seul et d'AmiC (Fig. IV.22B et C). Ceux-ci se trouvent tous localisés sur un seul des deux feuillets β qui composent le domaine AMIN (Fig. IV.22B). Il s'agit du feuillet externe du domaine AMIN qui se situe à l'opposé du site catalytique (Fig. IV.22C)

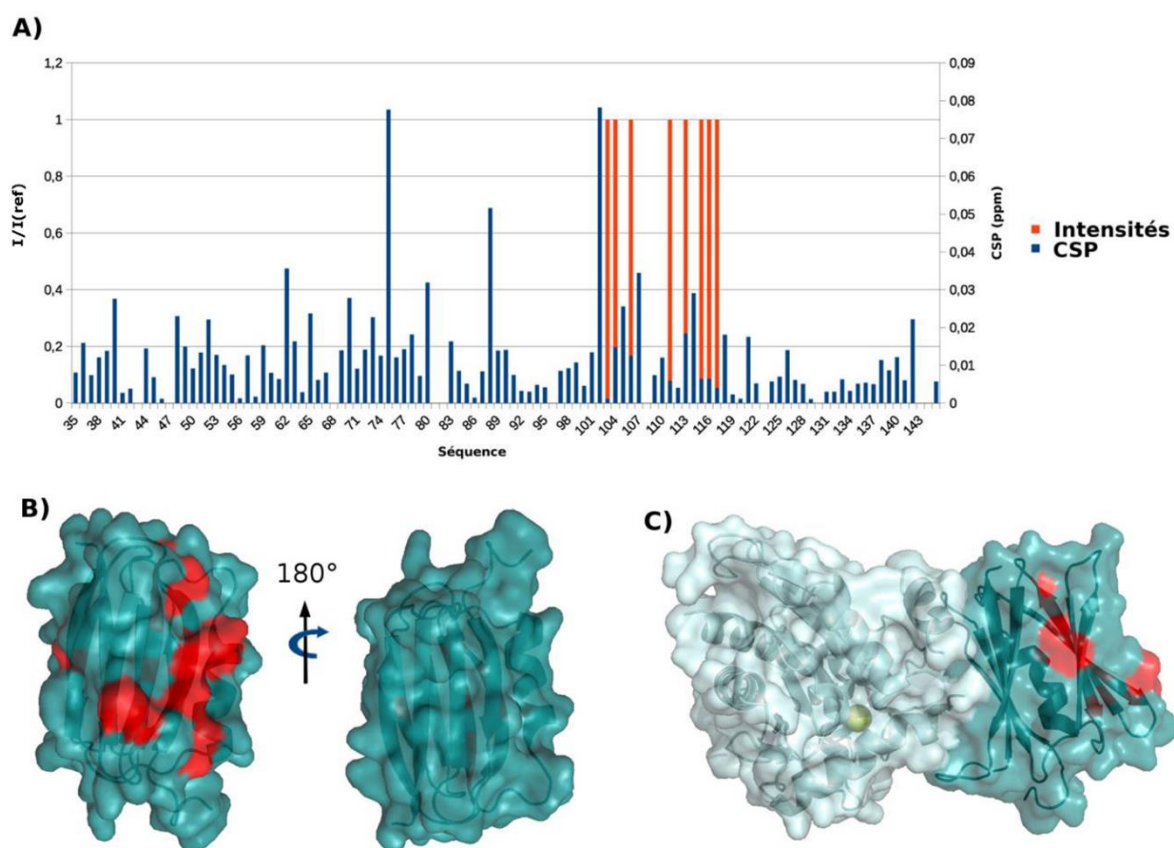


Figure IV.22 : Localisation de la zone d'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane traité par l'endopeptidase PBP4. **A.** Représentation des données expérimentales issues de la fig. IV.17B. Les variations d'intensité et de déplacement chimique significatives sont représentées respectivement en orange (valeur arbitraire de 1) et bleu. **B.** Localisation des résidus (en rouge) présentant des variations d'intensité supérieures à 0,6 et de déplacement chimique supérieur à 0,05 ppm (en A) sur la structure cristallographique du domaine AMIN. Ces résidus sont localisés uniquement sur un des deux feuillets β qui compose le domaine AMIN. **C.** Localisation des résidus (en rouge) présentant des variations d'intensité supérieures à 0,6 et de déplacement chimique supérieur à 0,05 ppm (en A) sur la structure cristallographique d'AmiC. Ils se situent sur le feuillet β externe de la protéine AmiC à l'opposé du site catalytique situé dans le domaine C-terminal de la protéine (en cyan clair) et contenant un ion Zn^{2+} représenté par une sphère verte.

La nature chimique des fragments de peptidoglycane semble avoir une importance dans l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane. En effet, les fragments de peptidoglycane générés par AmiC sont majoritairement composés de chaînes de glycanes nues dépourvues de la partie peptidique et conduisent probablement à une interaction non spécifique. Le peptidoglycane digéré par PBP4 est composé de fragments arborant des peptides (majoritairement des tetrapeptides), substrat naturel d'AmiC, et conduit à une interaction plus spécifique. Ces résultats démontrent que la présence de peptides sur les chaînes de glycanes est importante pour l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane. Afin de confirmer ces résultats avec la protéine AmiC entière, nous avons établi les conditions de production de la protéine en milieu minimum (Voir 2.13.7 du MetM). Celle-ci sera prochainement envoyée à l'équipe de Dr Simorre à Grenoble. Comme pour la purification du domaine AMIN (Fig. IV.18), on constate lors de l'élution, la présence de l'anhydrase carbonique de 25 kDa (Fig. IV.23A). Celle-ci est séparée de notre protéine d'intérêt

lors du second passage sur colonne d'affinité au nickel après digestion par la TEV (rendement 72%) (Fig. IV.23B).

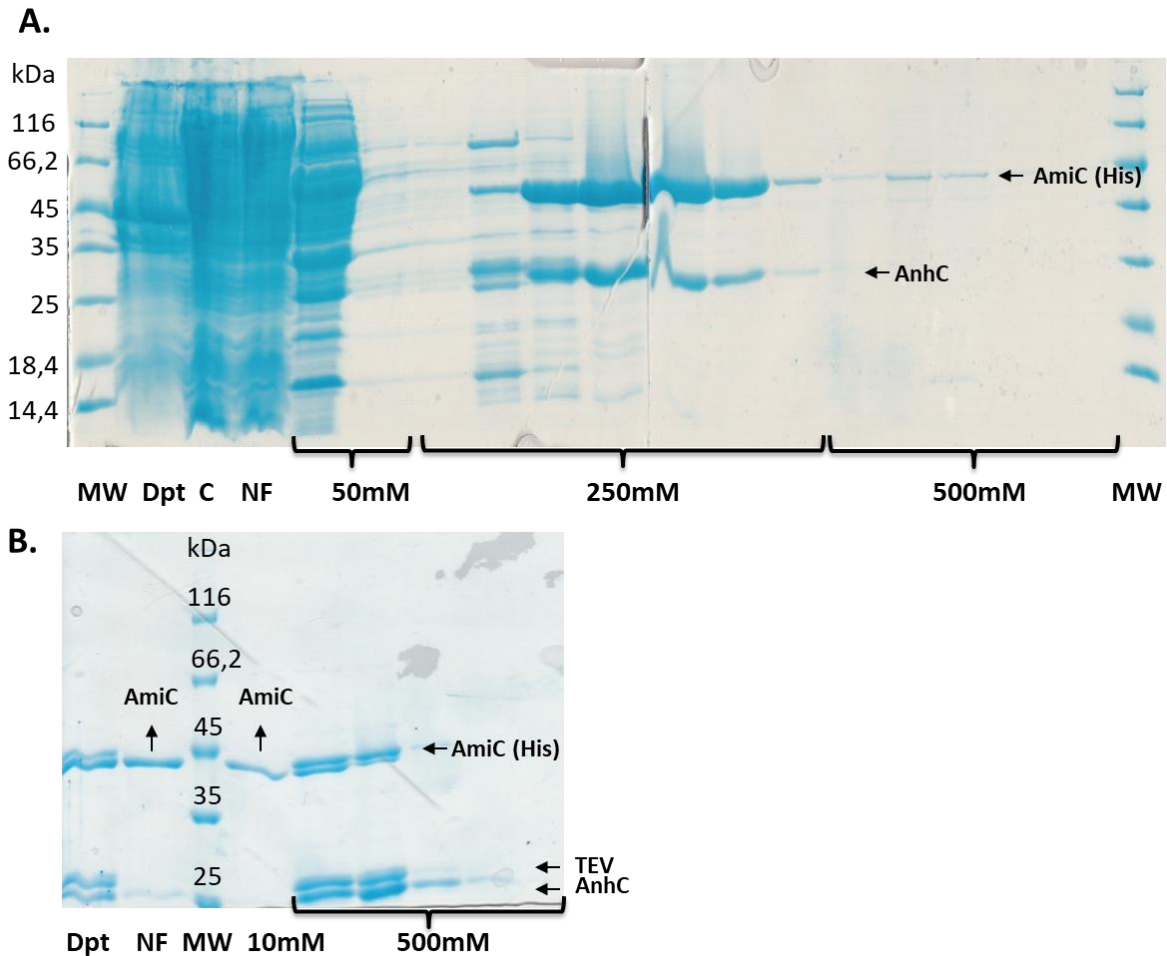


Figure IV.23 : Analyse SDS-PAGE de la production de la protéine AmiC en milieu minimum et de sa purification. A. SDS-PAGE sur gel 15% de la purification de la protéine AmiC (45 kDa) sur colonne d'affinité nickel. **B.** SDS-PAGE sur gel 15% de la purification d'AmiC après incubation avec la protéase TEV (27 kDa). On note la présence d'anhydrase carbonique à 25 kDa. **MW** : marqueur de poids moléculaire. **Dpt** : échantillon de départ. **NF** : fraction non fixée. **C** : culot. **10, 50, 250 et 500 mM** sont les concentrations en imidazole utilisées pour l'éluion.

2.1.2. Modèle bio-informatique de l'interaction du domaine AMIN avec le peptidoglycane.

Enfin, pour compléter l'étude de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane, l'équipe de l'IBS a établi un modèle structural par étude bio-informatique (Fig. IV.24). Ce modèle a été calculé et minimisé à l'aide des logiciels HADDOCK/CNS. Il correspond à un docking du peptidoglycane piloté par les contraintes de distance ambiguës entre les résidus perturbés et le peptidoglycane (Fig. IV.24B). Dans ce modèle, les couples R70/R112 et R102/E116 sont apparus comme étant les plus significatifs pour l'interaction (Fig. IV.24). De plus, ces quatre résidus font partie des résidus se trouvant conservés entre les deux feuillets β du domaine AMIN (Fig. IV.25A).

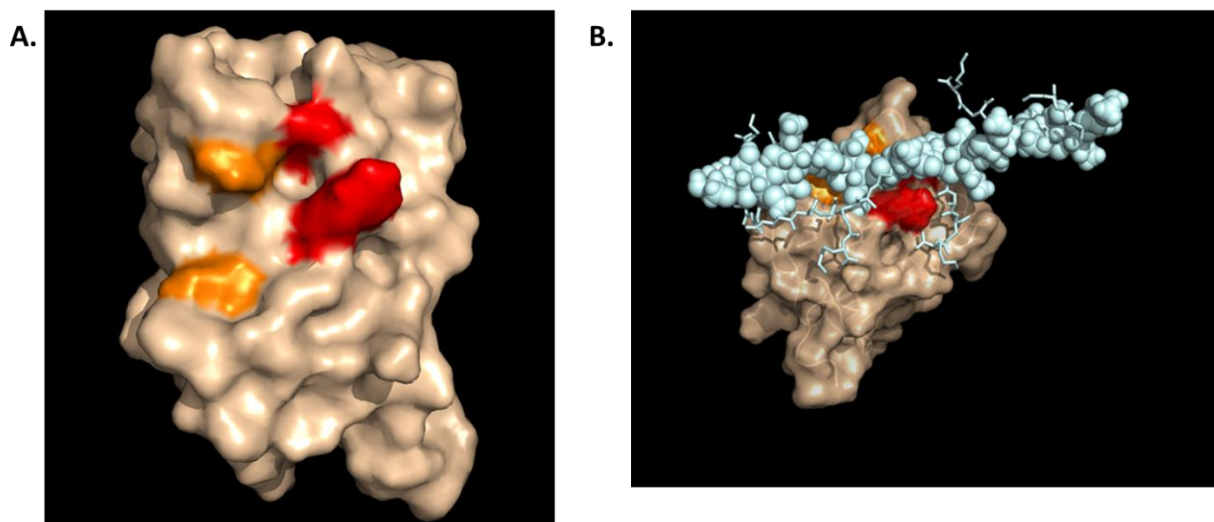


Figure IV.24 : Modèle bio-informatique de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane. A. zone d'interaction représentée sur le domaine AMIN. **B. Complexe structural** représentant l'interaction du domaine AMIN et du peptidoglycane (bleu). **En rouge** : le couple R102/E116. **En orange** : le couple R70/R112.

2.1.3. Identification par mutagenèse dirigée des résidus impliqués dans la localisation du domaine AMIN.

AmiC se localise au site de division par l'intermédiaire de son domaine AMIN. Dans le but de déterminer les résidus impliqués dans la localisation cellulaire du domaine AMIN, et de vérifier si celle-ci est dépendante du peptidoglycane, nous avons étudié par mutagenèse dirigée le rôle des résidus et motifs conservés, ceux identifiés par les expériences de RMN ou par le modèle bio-informatique, en les remplaçant essentiellement par une alanine (Fig. IV.25 P.112 et Tableau IV.2 p.116). Une fois les mutants (simple, double ou triple) obtenus, ceux-ci ont été caractérisés *in vivo* et *in vitro*. D'une part, les mutants sont produits, purifiés et leur affinité pour le peptidoglycane est testée par co-précipitation. D'autre part, la localisation cellulaire des mutants fusionnés à la sfGFP est suivie par microscopie à fluorescence.

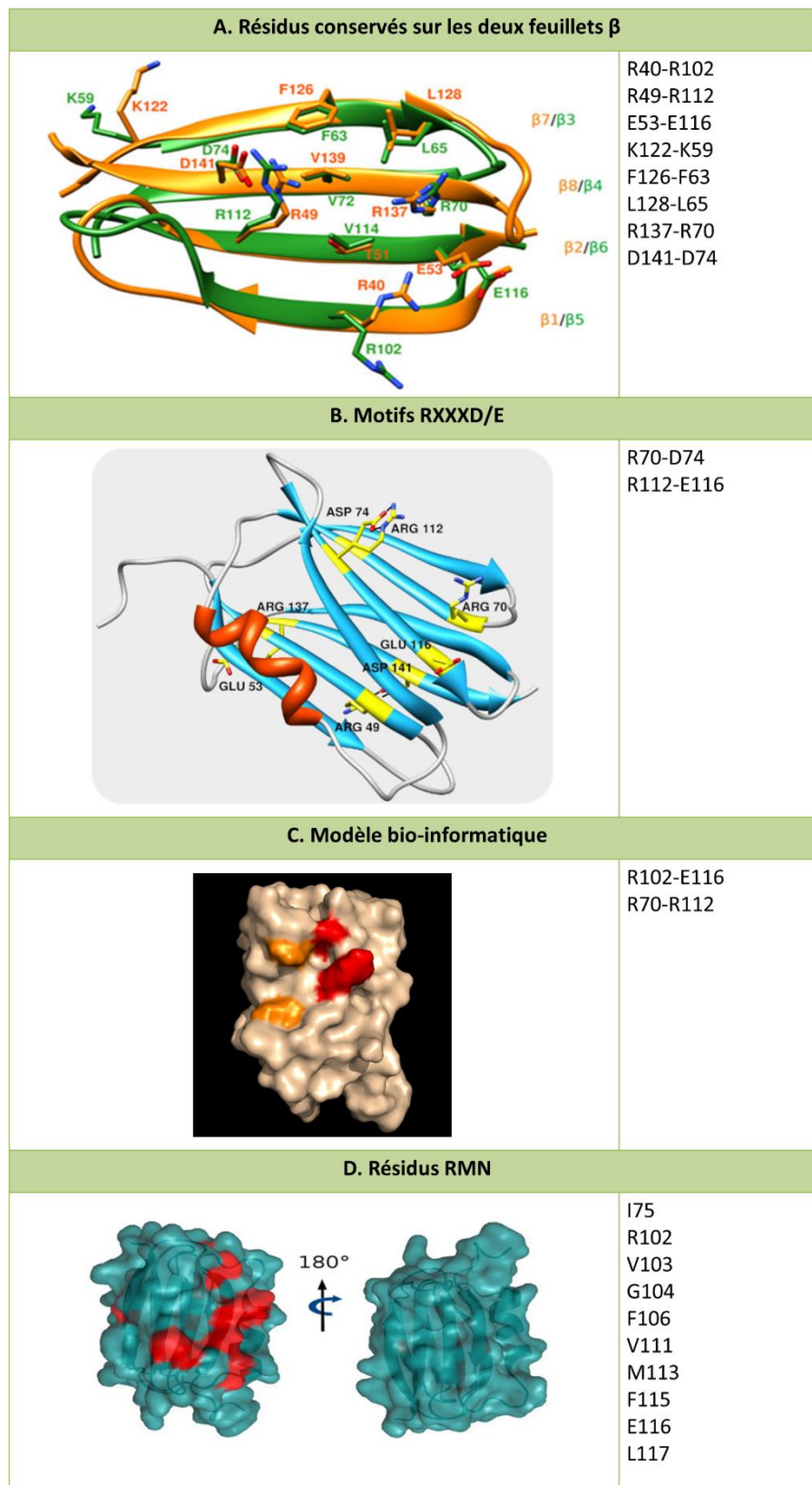


Figure IV.25 : Présentation des résidus d'intérêt pour la mutagenèse dirigée. **A.** superposition des deux feuillets β du domaine AMIN faisant apparaître les résidus conservés d'un feuillet à l'autre. En orange le feuillet β « interne ». En vert : le feuillet β « externe » **B.** Motifs RxxxD / E du domaine AMIN. Les résidus impliqués dans les motifs RxxxD/E sont représentés en jaune. L'hélice α et les brins β sont représentés respectivement en orange et en cyan. **C.** Modèle bio-informatique de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane. En rouge : le couple R102/E116. En orange : le couple R70/R112. **D.** Localisation des résidus (en rouge) identifiés dans l'étude RMN comme importants pour l'interaction avec le peptidoglycane. Ces résidus sont localisés uniquement sur le feuillet β externe du domaine AMIN.

2.1.3.1. Caractérisation des mutants du domaine AMIN par co-précipitation avec le peptidoglycane

Dans un premier temps, les protéines mutées sont produites et purifiées dans les mêmes conditions que la protéine sauvage. L'expression est induite à l'aide d'IPTG à une DO_{600nm} de 0.8 pendant trois heures à 28°C. Les protéines sont purifiées grâce à leur étiquette histidine qui est ensuite clivée par la protéase TEV. Après concentration, les protéines mutées sont incubées avec le peptidoglycane, lequel étant insoluble se retrouve au fond du tube (culot) après centrifugation. Les protéines mutées capables d'interagir avec le peptidoglycane seront également entraînées alors que celles qui n'interagissent plus avec le peptidoglycane se retrouvent dans la phase soluble (surnageant). Après séparation du surnageant et du culot, ce dernier est lavé deux fois puis traité avec du SDS pour éluer les protéines qui se seraient fixées. Si on ne retrouve pas la protéine mutée lors de l'élution, cela signifiera que le ou les résidus muté(s) est/sont important(s) pour l'interaction entre AmiC et le peptidoglycane. Parallèlement, la même expérience est réalisée sans peptidoglycane, pour vérifier que la protéine seule ne précipite pas. L'ensemble des fractions est analysé par SDS-PAGE. Pratiquement, la présence de protéine dans la fraction S correspond à un excédent de protéine ou à une perte d'affinité de la protéine pour le peptidoglycane, cette perte d'affinité est confirmée par l'absence de la protéine dans la fraction E (Fig. IV.26C). A titre d'exemple, l'ensemble les étapes décrites précédemment sont représentées dans la figure IV.26 pour la protéine porteuse de la mutation V103A. Le test de co-précipitation en présence de peptidoglycane de la protéine AMIN V103A montre qu'elle interagit toujours avec celui-ci.

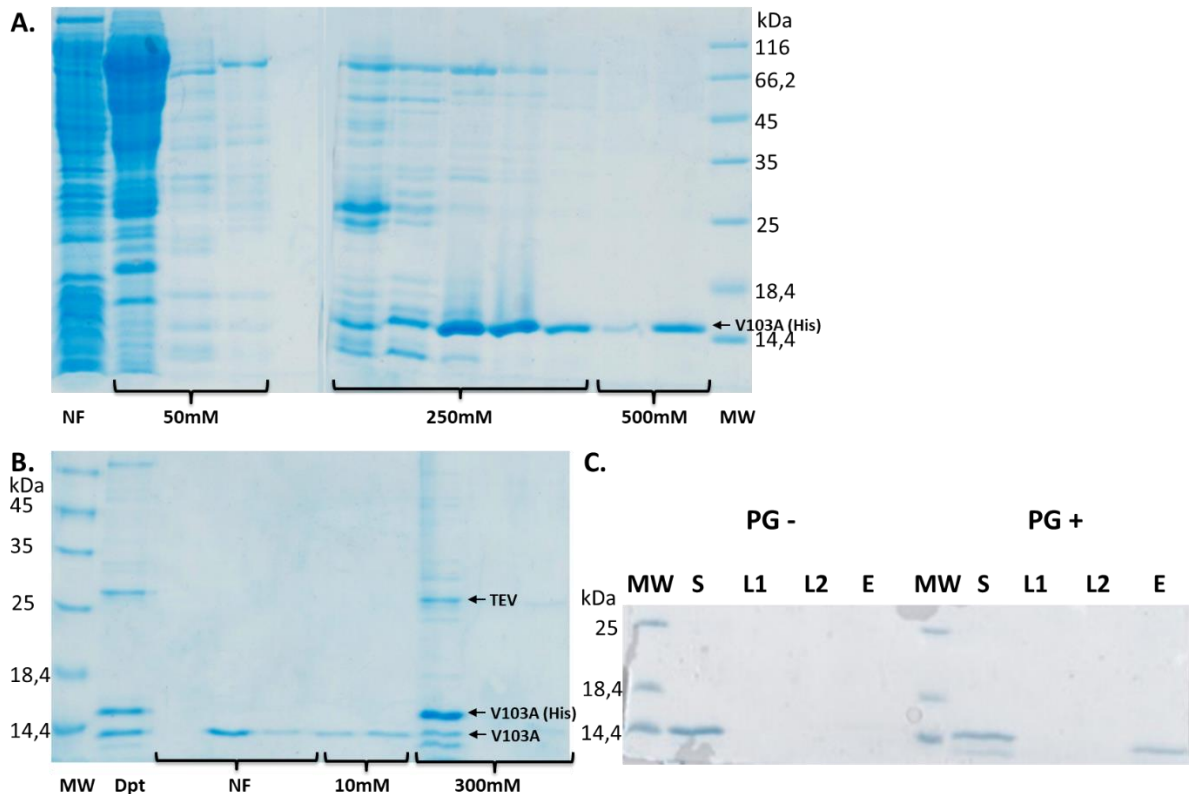


Figure IV.26 : Analyse de la purification, du clivage de l'étiquette histidine et du test de liaison au peptidoglycane du domaine AMIN V103A. A. Analyse SDS-PAGE sur gel 15% de la purification du domaine AMIN V103A. B. SDS-PAGE sur gel 15% de la seconde étape de purification du domaine AMIN V103A après clivage de son étiquette histidine par la protéase TEV. C. Test de co-précipitation du domaine AMIN V103A avec le peptidoglycane. MW : marqueur de poids moléculaire. Dpt : échantillon de départ. NF : fraction non fixée. 10, 50, 250, 300 et 500 mM sont les concentrations en imidazole utilisées pour l'éluion. S : surageant. L1 : premier lavage. L2 : second lavage. E : éluion.

A ce jour, les domaines AMIN mutés testés en co-précipitation ont tous montré une interaction avec le peptidoglycane (Tableau IV.2 p.116). Cependant, plusieurs études ont montré que le test de liaison au peptidoglycane *in vitro* pourrait conduire à de « faux positifs » dû à des interactions non spécifiques (Williams, 2010 ; Duncan, 2011). Pour pallier à cette possibilité, nous avons réalisé un vecteur permettant la production du domaine AMIN fusionné à la sfGFP afin de réaliser des expériences de localisation de la protéine dans la cellule.

Enfin, il est à noter certaines mutations entraînent une insolubilité de la protéine (Tableau IV.2). Pour ces protéines mutées insolubles, deux stratégies ont été mises en place pour essayer d'améliorer leur solubilité. Premièrement, nous avons fait varier les paramètres de température et de durée d'induction ainsi que la concentration en IPTG ajouté pour l'induction. Cependant bien que pour certaines mutations, nous avons pu obtenir des protéines solubles, la quantité n'était pas suffisante pour obtenir un résultat significatif lors du test de liaison au peptidoglycane. Deuxièmement, les mutations systématiques en alanine ne semblent pas être adaptées à tous les résidus d'intérêt. Nous avons donc opté pour des mutations moins drastiques en commençant par les résidus E116 et R112 dont la mutation en alanine entraîne systématiquement l'insolubilité de la protéine. De plus, ces résidus font partie des résidus conservés, du motif RXXXD/E ainsi que des résidus identifiés par RMN et confirmé comme potentiellement importants par modélisation.

2.1.3.2. Localisation par fluorescence des domaines AMIN mutés au site de division.

Le domaine AMIN d'AmiC est capable de se localiser au site de division indépendamment du domaine catalytique. Afin d'identifier les résidus importants pour cette localisation, nous avons fusionné les domaines AMIN sauvage ou mutés à la sfGFP (super folder GFP), une variante de la GFP capable d'être exportée et de montrer une fluorescence dans le périplasma. La protéine AmiC étant exportée par le système TAT, nous avons donc choisi de conserver le peptide signal natif de la protéine (Bernhardt and De Boer, 2003). Enfin, pour avoir une régulation précise de notre expression, nous avons choisi le vecteur d'expression pBAD. La construction a été testée en milieu minimum RM dans les cellules d'*E. coli* LMG194 induites par différentes concentrations en arabinose. Les extraits totaux issus de la lyse cellulaire des différentes cultures ont ensuite été analysés par SDS-PAGE (Fig. IV.27). La révélation de la fluorescence de la sfGFP montre une bande à la taille attendue de 42 kDa indiquant que le domaine AMIN et sa protéine de fusion sont bien produits. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de visualiser la protéine directement dans la cellule sans devoir la purifier et ce même si le niveau d'expression du gène est faible ou si la protéine est peu soluble. A l'heure actuelle, les tests de localisation sont toujours en cours. Parallèlement, il serait intéressant d'effectuer une analyse des extraits périplasmiques afin de vérifier l'exportation de la protéine couplée à la sfGFP.

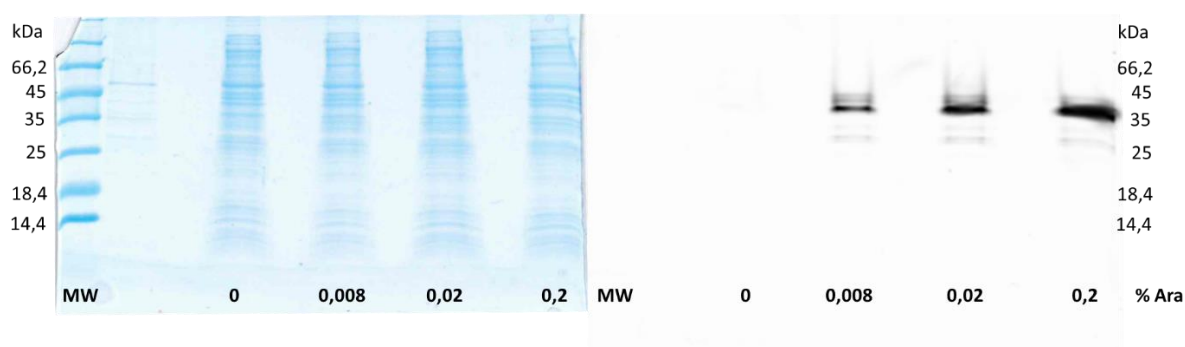


Figure IV.27 : Analyse de l'expression du domaine AMIN fusionné à la sfGFP. SDS-PAGE sur gel 15% des extraits cellulaires totaux après induction avec 0, 0.008, 0.02 et 0.2 % d'arabinose. A gauche : coloration au bleu de Coomassie. A droite : visualisation de la fluorescence par le Typhoon trio+. **MW** : marqueur de poids moléculaire

2.1.3.3. Tableau des mutations du domaine AMIN et résultats des purifications et caractérisation des protéines mutées.

Mutations des résidus du feuillet β interne (1)			
Mutations	Purification	Interaction	Fusion sfGFP
R40A	/	/	/
R49A	/	/	OK
E53A	/	/	OK
K122A	/	/	/
F126A	/	/	/
L128A	/	/	/
R137A	/	/	/
D141A	/	/	/
Mutations des résidus sur le feuillet β externe (2) et mutations des résidus provenant des études RMN			
Mutations	Purification	Interaction	Fusion sfGFP
K59A	OK	+	/
F63A	/	/	OK
L65A	/	/	/
R70A	INSOLUBLE	/	OK
D74A	OK	/	OK
I75A	OK	/	/
R102A	OK	+	OK
V103A	OK	+	/
G104A	OK	+	/
F106A	OK	+	/
v111A	/	/	/
R112A	INSOLUBLE	/	OK
M113A	OK	/	/
F115A	OK	/	/
E116A	INSOLUBLE	/	OK
L117A	OK	+	/
V103A/G104A	OK	+	/
F63A/L65A	/	/	/
R102A/V103A/G104A	OK	+	/
Doubles mutations des résidus conservés sur les feuillets β 1 et 2			
Mutations	Purification	Interaction	Fusion sfGFP
R40A/R102A	OK	+	/
R49A/R112A	INSOLUBLE	/	OK

E53A/E116A	INSOLUBLE	/	OK
K122A/K59A	OK	/	/
F126A /F63A	/	/	OK
L128A/L65A	OK	+	/
R137A /R70A	INSOLUBLE	/	OK
D141A /D74A	INSOLUBLE	/	/
Mutations des résidus du motif RXXXD/E du feuillet β 2			
Mutations	Purification	Interaction	Fusion sfGFP
R70A/D74A	INSOLUBLE	/	/
R112A/E116A	INSOLUBLE	/	/
Mutations des résidus du modèle bio-informatique			
Mutations	Purification	Interaction	Fusion sfGFP
R70A/R112A	INSOLUBLE	/	OK
R112K	INSOLUBLE	/	/
R102A/E116A	INSOLUBLE	/	OK
E116Q	OK	+	/

Tableau IV.2 : Mutations introduites dans le domaine AMIN et résultats de purification et co-précipitation avec le peptidoglycane. Dans la première colonne sont reprises les mutations introduites dans le domaine AMIN. Dans la seconde colonne, il est indiqué si le domaine muté a été purifié ou s'il était insoluble. La troisième colonne reprend les résultats du test d'interaction avec le peptidoglycane. Enfin, la dernière colonne indique les domaines mutés disponibles en fusion avec la sfGFP pour le test de localisation cellulaire. **INSOLUBLE** : protéine insoluble. + : la protéine mutante interagit avec le PG, **OK** : réalisé, disponible. / : non réalisé, non disponible.

Au terme de ce travail, 41 mutations (simple, double ou triple) ont été introduites dans le domaine AMIN en vue de caractériser leurs impacts sur l'interaction des protéines mutées avec le peptidoglycane et/ou leur localisation au site de division (Tableau IV.2). Parmi ces protéines mutées, 27 ont été purifiées et 12 d'entre elles se sont avérées insolubles. Onze des 15 protéines solubles ont pu être testées en co-précipitation avec le peptidoglycane. Elles ont toutes interagi avec le peptidoglycane indiquant que ces mutations même doubles ou triples dans certains cas, ne sont pas suffisantes pour empêcher cette interaction. Il faut noter cependant que des mutations de résidus potentiellement essentiels pour l'interaction ont conduit à des protéines insolubles ou peu produites, rendant ainsi difficile l'évaluation du rôle de ces mutations dans la liaison du domaine AMIN au peptidoglycane *in vitro*. D'où notre deuxième approche qui permettra d'analyser le rôle de ces résidus *in vivo* à l'aide de protéines en fusion avec la sfGFP.

2.2. Etude de la régulation de l'amidase AmiC par le domaine LytM de NlpD

La protéine NlpD contient un domaine LytM responsable de l'activation d'AmiC. Un Kd apparent de l'ordre de 10 μ M a pu être observé entre les protéines AmiC et NlpD entières par la technique de thermophorèse. La structure d'AmiC a révélé la présence d'une hélice

obstruant le site actif (Rocaboy *et al.*, 2013) (Fig. IV.28A et B). Il est proposé que le domaine LytM permettrait de déplacer cette hélice.

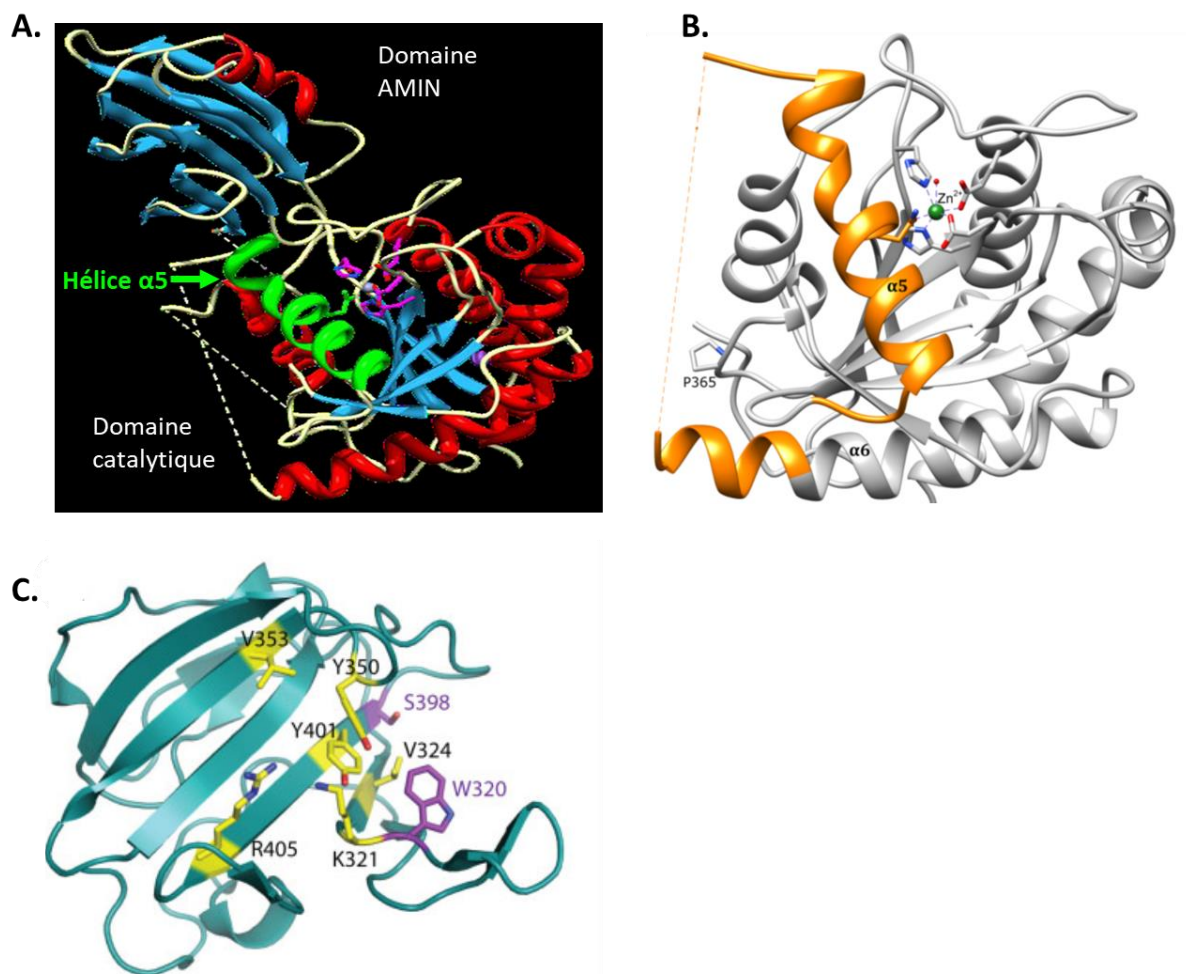


Figure IV.28: Structure cristallographique d'AmiC et EnvC. A. Structure d'AmiC avec en vert l'hélice $\alpha 5$ obstruant le site actif de la protéine B. Structure du domaine catalytique d'AmiC avec l'hélice inhibitrice $\alpha 5$ en orange, l'ion zinc est en vert et les résidus impliqués dans la chélation sont représentés en bâtonnet. C. Structure du domaine LytM d'EnvC. Les résidus importants pour la fonction de EnvC sont reportés en jaune sur la structure. (Peters *et al.*, 2013; Rocaboy *et al.*, 2013)

Néanmoins le mécanisme d'activation de l'amidase AmiC par le domaine LytM de NlpD est encore mal connu. Afin de mieux comprendre l'interaction entre ces deux protéines, nous avons décidé de mener des études cristallographiques et en particulier celle du domaine LytM de NlpD.

La protéine LytM de 13,6 kDa a été produite et purifiée comme décrit aux points 2.13.5 et 2.13.6 du matériel et méthodes. L'expression est induite à l'aide d'IPTG à une DO_{600nm} de 0.8 pendant trois heures à 28°C. La protéine est purifiée grâce à son étiquette histidine qui est ensuite clivée par la protéase TEV avec un rendement de 89% (Fig. IV.29). Par la suite, la protéine est concentrée avant d'être déposée sur tamis moléculaire afin d'éliminer d'éventuels agrégats. Enfin la protéine est à nouveau concentrée par centrifugation avant d'être déposée dans des plaques 96 ou 24 puits contenant les diverses conditions de cristallisation (Fig. IV.30A).

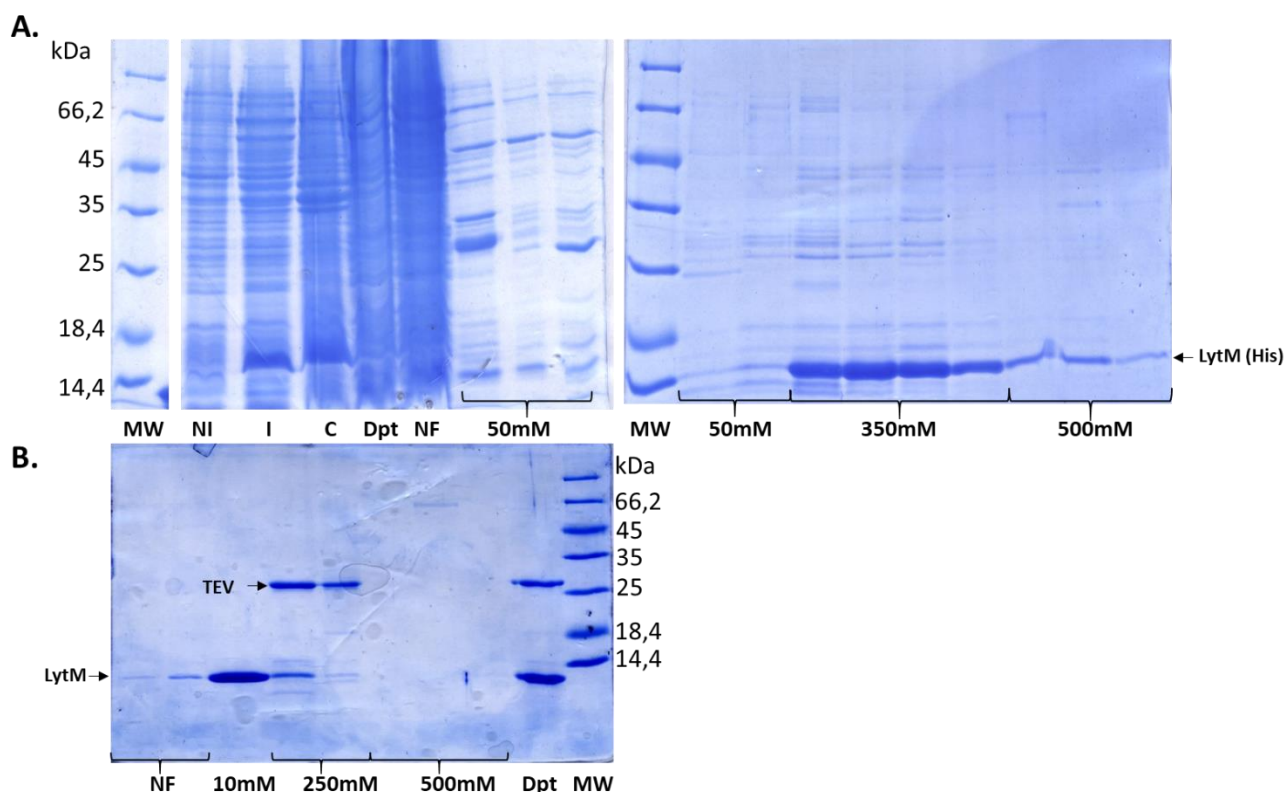


Figure IV.29 : Analyse de la purification et du clivage de l'étiquette histidine du domaine LytM de NlpD. A. Analyse SDS-PAGE sur gel 15% de la purification du domaine LytM. **B.** SDS-PAGE sur gel 18% de la seconde étape de purification du domaine LytM après clivage de son étiquette histidine par la protéase TEV. **MW** : marqueur de poids moléculaire. **NI** : non-induit. **I** : induit. **Dpt** : échantillon de départ. **C** : culot. **NF** : fraction non fixée. **10, 50, 250, 350 et 500 mM** sont les concentrations en imidazole utilisées pour l'élué.

Un premier criblage de conditions avait permis d'obtenir des cristaux de faible qualité diffractant au mieux à 3.5 Å. Nous nous sommes basés sur cette condition de cristallisation (100 mM Tris-HCl pH8.5, PEG3350 30%, NaCl 300mM) pour générer des conditions pour un criblage d'affinement. Parallèlement, la protéine a aussi été testée dans les conditions de cristallisation du Kit Membfac (annexe G). Dans les deux cas, un rapport 3:2 et 2:2 (v/v) de la solution protéique et la solution de puits a été testée et ce à deux températures 20°C et 4°C. C'est finalement, un cristal obtenu dans la condition du test d'affinement composée de 100mM Tris-HCl pH9, PEG3350 26,8% (w/v), NaCl 200mM qui nous a permis de collecter un premier jeu de données de diffraction des rayons X. Le cristal utilisé appartient au groupe spatial monoclinique C2. L'obtention des phases initiales a été tentée par la méthode du remplacement moléculaire avec le programme Phaser en utilisant la structure du domaine LytM de EnvC comme modèle de recherche (code pdb 4BH5) (McCoy, 2006) (Fig. IV.28C). Malgré l'identité de séquence de 44% entre le domaine LytM de EnvC et celui de NlpD, nous n'avons pas pu obtenir une solution de remplacement moléculaire pouvant être correctement affinée. Probablement à cause des 6 molécules présentes dans l'unité asymétrique et à la présence d'une symétrie translationnelle non cristallographique (Fig. IV.30B). Un micro-seeding a alors été réalisé afin d'obtenir d'autres types de cristaux, mais à ce jour ces derniers n'ont pas montrés de résolution suffisante.

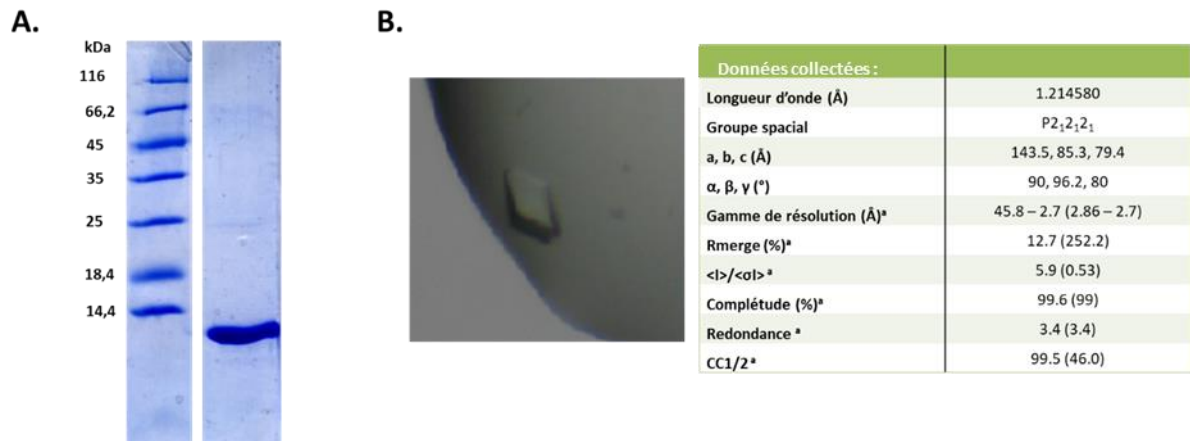


Figure IV.30 : Résultats de cristallisation du domaine LytM de NlpD. **A.** Analyse SDS-PAGE montrant la protéine LytM après purification et concentration jusqu'à 8,3 mg/mL **B.** Photo du cristal de la protéine et tableau des données cristallographiques et statistiques de l'affinement de la structure.

V. Discussion

1. Chapitre 1 : synthèse du peptidoglycane

1.1. **Formation d'un complexe ternaire entre FtsW, PBP3 et PBP1b.**

Dans ce travail, nous avons étudié les activités et les interactions des protéines du divisome responsables de la synthèse du peptidoglycane chez *E. coli*. Nos résultats montrent que PBP1b, PBP3 et FtsW forment un complexe ternaire *in vitro*. Un tel complexe contient les activités enzymatiques nécessaires pour construire le peptidoglycane septal, à savoir l'activité glycosyltransférase pour l'élongation des chaînes de glycane et l'activité transpeptidase pour le pontage peptidique ainsi qu'une activité flippase potentielle. La PBP1b bifonctionnelle fournit les deux premières activités, la PBP3 l'activité transpeptidase spécifique du divisome et enfin FtsW posséderait l'activité flippase et/ou glycosyltransférase. Nos résultats sont en accord avec des études précédentes d'interaction protéine-protéine, à l'aide du système double hybrides bactérien, et de localisation (Egan and Vollmer, 2013; Gray *et al.*, 2015). Ceci renforce l'idée que les trois protéines travaillent ensemble pendant la division, en coordination avec d'autres protéines du divisome. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les PBPs de classe A et B (ici PBP1b et PBP3) font partie des mêmes complexes multiprotéiques de synthèse du peptidoglycane (Holtje, 1998; Banzhaf *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2017). Au vu des complexes isolés, nous concluons que notre méthode de co-expression, co-purification permet de mettre en évidence des interactions relativement fortes et stables entre les protéines. La comparaison des données provenant de différentes paires de surexpression a ainsi pu fournir de nouvelles informations sur la stabilité des interactions entre les protéines PBP1b, PBP3, FtsW et FtsN. En effet, les complexes FtsW-PBP3 et FtsW-PBP1b ont été facilement obtenus suggérant qu'ils sont maintenus par des interactions plus fortes que celles entre PBP1b et PBP3. Par conséquent, PBP1b est probablement recrutée au site de division grâce à des interactions multiples et simultanées avec le complexe FtsW-PBP3. Ces résultats sont cohérents avec la localisation PBP3-dépendante de PBP1b au centre de la cellule (Bertsche *et al.*, 2006). Ainsi, les données d'activité et les interactions mises en évidence entre PBP1b et plusieurs protéines du divisome tendent à s'opposer au nouveau modèle de synthèse du peptidoglycane. En effet dans celui-ci, il est proposé que le peptidoglycane soit synthétisé d'une part par les PBPs de classe A de manière « semi-autonomes » à l'extérieur de l'élongasome et du divisome dans lesquels l'activité glycosyltransférase serait assurée uniquement par les protéines SEDS RodA et FtsW (Meeske, Riley, *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2017; Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018).

Ensuite, il avait déjà été démontré que la boucle entre les TM 9 et 10 de FtsW est nécessaire pour l'interaction avec PBP3 et pourrait également être impliquée dans l'interaction avec PBP1b (Pastoret *et al.*, 2004; Fraipont *et al.*, 2011). On sait aussi que la plus grande boucle comprise entre les TM 7 et 8 (~ 66 résidus) de FtsW est cruciale pour la fonction de la protéine (Pastoret *et al.*, 2004). Nos résultats démontrent que l'introduction de l'épitope HA dans cette boucle affaiblit la liaison entre le FtsW_{HA} et PBP3, au point que le complexe ne peut plus être détecté. Cependant, la formation du complexe FtsW_{HA}-PBP1b n'a pas été affectée par cette insertion. Ces observations indiquent que la boucle entre les TM 7 et 8 contribue à l'interaction

de FtsW avec PBP3 mais ne semble pas jouer un rôle dans l'interaction avec PBP1b. Ceci concorde avec les études d'interaction entre FtsW et PBP3 chez *M. tuberculosis* montrant que les deux dernières boucles extracellulaires de FtsW jouent également un rôle important dans la liaison de PBP3 (Datta *et al.*, 2006). Enfin, l'absence de paires de co-expression comprenant FtsN démontre que celui-ci interagit de manière faible ou très dynamique avec les protéines FtsW, PBP1b et PBP3. Nous ne sommes pas non plus parvenu à isoler FtsN, lors de la formation du complexe ternaire malgré les interactions multiples préalablement identifiées par des études d'interaction protéine-protéine (Di Lallo *et al.*, 2003; Karimova *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007). La prochaine étape est d'élargir le complexe en incluant les protéines du sous-complexe FtsQLB qui interagissent avec FtsW et PBP3 (Trip and Scheffers, 2015). Mais aussi avec FtsN avec qui FtsQLB semble collaborer afin de réguler la synthèse du peptidoglycane septal (Liu *et al.*, 2015). Les nouveaux complexes ainsi isolés, après avoir été soumis aux tests d'activité, pourront apporter de nouvelles informations sur l'effet des protéines FtsQLB, FtsN et FtsW sur les activités enzymatiques de PBP1b et PBP3.

1.2. PBP3 module l'interaction entre FtsW et le lipide II

Nous avons ensuite constaté un effet inhibiteur de FtsW sur la polymérisation du lipide II par PBP1b ainsi que la suppression de cet effet inhibiteur par PBP3. Nous avons alors démontré que l'effet inhibiteur de FtsW était dû à son interaction directe avec le lipide II. Ces résultats pris ensemble suggèrent fortement l'existence d'un mécanisme de régulation de FtsW impliquant PBP3. Sur la base de ces résultats, nous proposons : (i) que FtsW seul interagit avec une forte affinité avec le lipide II et empêche sa polymérisation par PBP1b, (ii) que l'interaction de PBP3 avec FtsW module l'interaction entre FtsW et le lipide II pour que ce dernier soit accessible à PBP1b. Il est possible que l'interaction de PBP3 avec FtsW induise un changement de la conformation de FtsW qui facilite la libération du lipide II. FtsW et PBP3 sont exprimés à des niveaux similaires dans les cellules et les deux protéines forment un complexe avant leur localisation au site de division. Par conséquent, seul le complexe FtsW-PBP3 actif pourrait être présent *in vivo*. Ceci est cohérent avec ce que nous observons lors de la surexpression de FtsW ou du complexe FtsW-PBP3. En effet, lors de la surexpression de FtsW, il y a une inhibition de la croissance cellulaire alors que la surproduction du complexe FtsW-PBP3 n'affecte pas celle-ci (Khattar *et al.*, 1994) (Fig. IV.14). Selon nos observations, l'effet de FtsW lors de sa surexpression sur la croissance cellulaire serait dû à la séquestration de lipide II par la protéine surexprimée. Ainsi, les observations faites *in vitro* semblent s'opérer également *in vivo*. Malgré une interaction entre FtsW d'*E. coli* et le lipide II, cette protéine, en présence et en absence du PBP3, ainsi que deux de ses orthologues (FtsWKp et FtsWSe) n'ont montré aucune activité glycosyltransférase. Cependant, cette activité a été observée pour d'autres protéines SEDS dont RodA de *B. subtilis* et d'*E. coli* ainsi que FtsW de *Streptococcus thermophilus*, *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Meeske, Riley, *et al.*, 2016; Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018). Toutefois, dans le cas de RodA d'*E. coli* et celui des différents FtsW la présence du PBP de classe B partenaire de ces protéines ont été un prérequis à leurs activités (Rohs *et al.*, 2018; Taguchi *et al.*, 2018). Il faut noter également qu'aucune activité de polymérisation n'a

été rapporté pour RodA de *Thermus thermophilus* dont la structure a récemment été résolue (Sjodt *et al.*, 2018). D'autres résultats encore montrent que FtsW et RodA pourraient ne pas assurer la même fonction (Rubino *et al.*, 2018). Ces nouveaux résultats montrent des différences entre les protéines SEDS étudiées et soulèvent encore des questions : pourquoi certaines protéines SEDS n'ont pas d'activité GTase même en présence du PBP partenaire ? Quel est le rôle du PBP partenaire, ce dernier participe-t-il à l'activité catalytique ou joue-t-il le rôle d'activateur ? les protéines SEDS pourraient-elles en même temps être des glycosyltransférases et des flippases ?

1.3. Relation entre FtsW, MurJ et le lipide II

Nous avons démontré que FtsW interagissait directement avec le lipide II en conditions natives, ce que nous n'avons pas pu observer pour MurJ. Cependant, une nouvelle étude basée sur la spectrométrie de masse en conditions natives a démontré que l'affinité de MurJ pour le lipide II est plus élevée que celle de FtsW (Bolla *et al.*, 2018). L'interaction de MurJ avec le lipide II serait notamment sensible au pH et aux phospholipides, les différences de résultats pourraient donc être liées aux différentes conditions d'expérimentation. Dernièrement, une étude *in vivo* chez *E. coli*, a montré que MurJ se localise à la fois au niveau de la partie latérale ainsi qu'au centre de la cellule et que celle-ci est recrutée au site de division en même temps que les protéines tardives du divisome et les protéines MraY et MurG, qui sont nécessaires pour la synthèse de lipide II (Liu *et al.*, 2017). Ils ont également montré que cette localisation septale de MurJ dépend de l'activation du divisome, de la synthèse de lipide II et de FtsW (Liu *et al.*, 2017). Ces résultats pris ensemble avec la capacité de FtsW de lier le lipide II suggèrent que la liaison et la présentation du lipide II par FtsW entraînent le recrutement de MurJ et permettent le flip du lipide II par celle-ci. L'activité glycosyltransférase de FtsW pourrait aussi signifier que MurJ permet la présentation du lipide II à FtsW. Néanmoins, ici encore, des études complémentaires sur la relation entre MurJ et FtsW sont nécessaires pour comprendre le mécanisme qui permet au lipide II de traverser la membrane cytoplasmique. Il faut noter enfin que les progrès réalisés ces dernières années offrent des pistes intéressantes qui vont sans doute aider à mieux orienter les recherches pour définir le rôle exact des protéines SEDS et MurJ dans la synthèse du peptidoglycane et clarifier le mécanisme de translocation du lipide II.

1.4. Modèle de la régulation de l'activité de FtsW par PBP3

Il a été proposé que la fonction de transport potentiel de FtsW pourrait être médiée par une structure de type pore et la structure de RodA de *T. thermophilus* montre la présence d'une cavité ouverte sur la face périplasmique (Mohammadi *et al.*, 2014; Sjodt *et al.*, 2018). Dès lors, la grande boucle entre les TM7 et 8 pourrait jouer un rôle régulateur par un mécanisme d'ouverture/fermeture du pore du côté périplasmique. Comme cette boucle semble interagir avec PBP3, probablement par son domaine non catalytique, cette interaction pourrait induire un changement de conformation de la boucle entre les TM7/8. Ce changement permettrait la

libération du lipide II et/ou son transfert direct au PBP1b. Ce mécanisme expliquerait l'effet observé de PBP3 sur l'interaction de FtsW avec le lipide II (Fig. V.1). Une autre possibilité serait que l'interaction de PBP3 avec FtsW induirait un réarrangement structural au niveau des segments transmembranaires de FtsW qui modifierait la conformation de la boucle TM7/8 et conduirait à la libération du lipide II (Fig. V.1). Afin de mieux comprendre la régulation de FtsW par PBP3 et de déterminer les zones d'interactions, des mutants du domaine non catalytique de PBP3 pourraient être réalisés. Nous pourrions ainsi aussi étudier l'effet des mutants de cette zone sur le couple FtsW-PBP3 en présence du lipide II.

On a montré que le modèle structural de FtsW réalisé par la méthode de coévolution présente des homologies structurales avec des transférases non apparentées fonctionnellement qui utilisent un transporteur polyprényl-sucre comme substrat (Ovchinnikov *et al.*, 2015). Ces protéines sont AglB qui est une protéine des archées et PglB qui est présente chez les eubactéries et présentent toutes deux une activité oligosaccharyltransférase (OST) (Matsumoto *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2014; Petrou *et al.*, 2016). Elles catalysent la N-glycosylation de protéines en utilisant le polyprényl-phospho-sucre en tant que donneur. Leurs structures comportent une boucle caractéristique longue et dynamique entre les TM9 et 10 qui oscille entre l'état structuré et non structuré pour faciliter la libération du produit glycosylé du site actif (Matsumoto *et al.*, 2013). ArnT est une OST avec un repliement similaire à celui de PglB et AglB mais sa fonction est différente, elle est impliquée dans l'attachement de l'undécaprényl-L-Ara4N au lipide A. ArnT présente également une boucle périplasmique flexible entre les TM7 et 8 qui joue un rôle important en contrôlant la cavité contenant le lipide A par un changement structural (Petrou *et al.*, 2016). Ce mécanisme de régulation via une boucle périplasmique mobile pourrait également s'appliquer à FtsW (Fig. V.1).

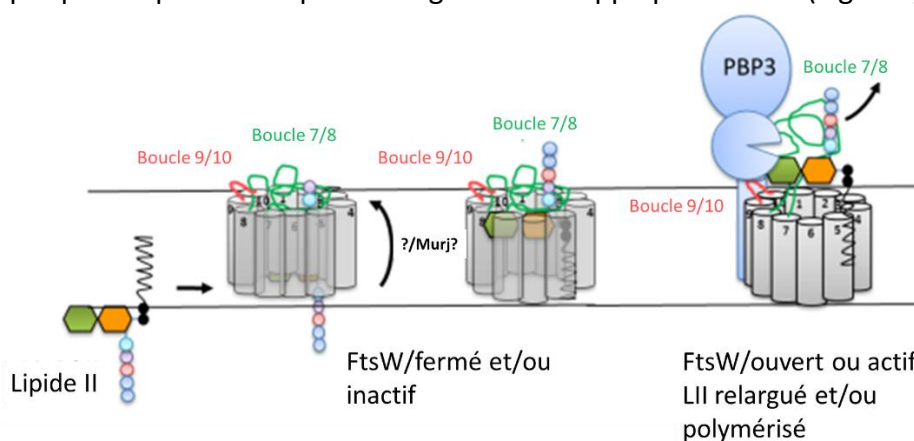


Figure V.1 : Modèle de régulation de l'activité de FtsW par PBP3.

En conclusion, nous avons montré que FtsW, PBP3 et PBP1b forment un complexe ternaire *in vitro* et que FtsW interagit avec le lipide II, cette interaction étant modulée par PBP3. Nous avons également montré que la boucle entre les TM 7 et 8 est importante pour l'interaction de FtsW avec PBP3 et que cette interaction peut jouer un rôle dans la régulation de l'interaction entre FtsW et le lipide II. Sur la base de ces résultats, nous proposons un modèle où le lipide II reste attaché à FtsW et que sa libération est facilitée par PBP3 via des changements conformationnels allostériques impliquant probablement la boucle entre les TM

7/8 de FtsW et/ou les TM de celle-ci (Fig. V.1). Ce mécanisme de régulation permet de garantir que le lipide II, présent en quantité limitée dans la cellule, soit concentré à l'endroit de la synthèse du peptidoglycane.

2. Chapitre 2 : Hydrolyse du peptidoglycane septal

Nous avons confirmé par RMN que le domaine AMIN d'AmiC interagissait avec le peptidoglycane et que la nature du peptidoglycane était fondamentale dans la spécificité de cette interaction. En effet, seul un peptidoglycane arborant des chaînes peptidiques semble capable d'interagir spécifiquement avec le domaine AMIN. De plus, ces résultats ont permis de mettre en évidence 11 résidus potentiellement impliqués dans cette interaction (I75, A88, R102, V103, G104, F106, V111, M113, F115, E116 et L117). Un modèle structural tenant compte des résultats RMN a mis en évidence deux couples de résidus importants pour l'interaction, R102/E116 et R70/R112. Ces 13 résidus peuvent être classés en deux catégories ; une majorité sont des résidus hydrophobes et les autres sont des résidus chargés. Ceci pourrait indiquer la présence d'une poche hydrophobe nécessaire pour accueillir un polysaccharide. Comme récemment décrit pour l'interaction de la chitotriosidase humaine avec la chitine (Crasson *et al.*, 2017). La chitriosidase présente une poche hydrophobe dans laquelle les résidus P451, G453, L454 et V455 ont été identifiés comme importants pour la bonne conformation de cette poche. L'interaction directe avec la chitine se fait par un tryptophane et un ensemble de résidus polaires non chargés. Or, il n'y a pas de résidu de ce type dans les 13 résidus pressentis pour l'interaction du domaine AMIN avec le peptidoglycane, ce qui pourrait expliquer pourquoi la chitotriosidase est incapable de lier le peptidoglycane (Crasson *et al.*, 2017). Par contre, les quatre résidus chargés identifiés dans le domaine AMIN pourraient jouer un rôle direct dans cette interaction. C'est ce qui apparaît chez certaines transglycosylases lytiques comme Slt70, Slt35 ou encore MltE d'*E. coli* ainsi que chez certaines amidases comme AmiD de *E. coli* et AmpD de *C. freundii* (Van Asselt, Dijkstra, *et al.*, 1999; Van Asselt, Thunnissen, *et al.*, 1999; Van Asselt *et al.*, 2000; Liepinsh *et al.*, 2003; Kerff *et al.*, 2010; Fibriansah *et al.*, 2012). En effet, on retrouve systématiquement des résidus chargés impliqués directement dans l'interaction avec les sucres et/ou les résidus peptidiques. Il a été démontré que la transglycosylase lytique Slt70 reconnaissait spécifiquement la partie peptidique et que les résidus R448, R476, N590, Y594, Y597 étaient responsables de cette interaction. Le résidu E583 serait un résidu important dans la reconnaissance de la partie saccharidique (Fig. V.2B). MltE quant à elle reconnaît uniquement la partie saccharidique du peptidoglycane, deux résidus semblent importants dans cette liaison à la partie saccharidique : les résidus L195 et R191 (Van Asselt, Thunnissen, *et al.*, 1999; Fibriansah *et al.*, 2012) (Fig. V.2A). Au vu des résidus mis en évidence dans le domaine AMIN, on pourrait imaginer un mécanisme de reconnaissance du peptidoglycane situé entre Slt70 et MltE (Fig. V.2). Ceci permettrait d'expliquer la capacité du domaine AMIN à interagir de manière aspécifique avec un peptidoglycane dénudé et de manière spécifique avec un peptidoglycane possédant des portions peptidiques.

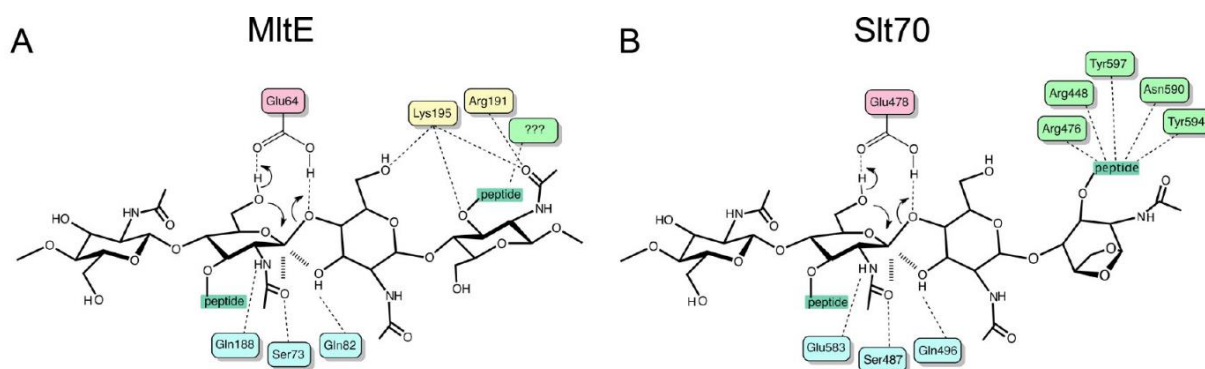


Figure V.2 : Modèle de liaison au peptidoglycane de MltE et Slt70. Bien que les interactions avec le résidu MurNAc et le lien glycosidique scissile sont fortement conservées, les interactions avec le résidu muropeptide suivant sont différentes. MltE reconnaît spécifiquement la fraction saccharidique du résidu muropeptide, tandis que Slt70 reconnaît la fraction peptidique (Fibriansah *et al.*, 2012).

L'ensemble des résidus identifiés se situe sur le second feuillet- β du domaine AMIN, ce qui suggère que malgré l'homologie importante entre les deux feuillets- β , seul le feuillet externe interagit avec le peptidoglycane. Ce résultat est en concordance avec les observations effectuées pour AmiB. Effectivement, l'amidase AmiB se localise aussi au site de division via sa région N-terminale (Peters *et al.*, 2011). La prédiction de la structure secondaire de cette région lui accorde 8 brins- β comme dans le cas du domaine AMIN d'AmiC. De plus, l'alignement de séquence avec le domaine AMIN d'AmiC montre de grandes similarités uniquement avec les résidus du second feuillet- β (4 résidus identiques et 3 résidus similaires). La présence de deux feuillets- β symétriques dans le domaine AMIN d'AmiC et de la plupart de ses homologues n'aurait donc pas pour rôle une double interaction avec le peptidoglycane comme suggéré précédemment par Rocaboy *et al.*, 2013. Prochainement, une étude RMN sera réalisée avec la protéine AmiC entière afin d'étudier le mode d'interaction de la protéine avec le peptidoglycane. L'étude en RMN de l'interaction entre le peptidoglycane marqué isotopiquement et AmiC pourrait aussi apporter des informations sur les caractéristiques du peptidoglycane impliqué dans cette interaction.

Toujours dans le but d'identifier les résidus du domaine AMIN d'AmiC impliqués dans l'interaction avec le peptidoglycane, différents mutants de celui-ci ont été produits, purifiés et testés par co-précipitation avec le peptidoglycane. Cependant, tous les mutants testés se sont avérés toujours capables d'interagir avec le peptidoglycane. Des études ont montré que ce type de test *in vitro* de liaison au peptidoglycane pourrait ne pas être suffisant pour identifier l'effet de mutations, vu le nombre de résidus impliqués dans l'interaction. Pour y remédier, nous avons élaboré une construction permettant la localisation du domaine AMIN et ses mutants *in vivo* à l'aide d'une fusion avec la sfGFP. Les tests de localisation sont actuellement en cours et devraient permettre de mettre en évidence certains résidus importants dans la localisation. Afin de compléter l'étude de l'interaction entre le domaine AMIN et le peptidoglycane, une étude RMN des mutants qui seront identifiés comme incapables de se localiser pourrait être réalisée.

Enfin, concernant l'insolubilité de certains mutants du domaine AMIN, on remarque que les protéines mutées qui montrent une insolubilité contiennent un ou deux des 5 résidus suivants ; R70, D74, R137, R112, E116 et D141. Ces résidus font tous partie des 4 motifs RXXXD/E et se situent sur la face externe des deux brins centraux de chaque feuillet- β du domaine AMIN. Ces résidus pourraient donc s'avérer importants dans le repliement et la stabilité de la protéine. De plus, les résidus R49 et R112 sont impliqués dans des ponts salins, avec les aspartates D141 et D74 respectivement, des motifs localisés sur les brins antiparallèles adjacents. Ces deux interactions R49/D141 et R112/D74 pourraient donc être importantes pour la stabilité de la protéine (Rocaboy *et al.*, 2013). Dès lors, la mutation en alanine de ces résidus pourrait être trop drastique pour maintenir un repliement correct de la protéine, donnant lieu à l'insolubilité de la protéine mutée. Des remplacements par des résidus moins éloignés du résidu d'origine ont été réalisés, permettant ainsi de maintenir la solubilité du mutant E116Q mais toujours pas celle du mutant R112K. Cependant, le mutant E116Q s'est avéré capable de se lier au peptidoglycane, la mutation pouvant ici ne pas être suffisamment drastique. On pourrait imaginer d'inverser les résidus des ponts salins pour régler ces différents problèmes. Avec toutes ces pistes, en fonction des observations qui seront faites lors du test de localisation *in vivo*, les mutations pourront ainsi être ajustées au cas par cas.

En conclusion, nous avons démontré que le domaine AMIN d'AmiC interagissait avec le peptidoglycane. Nous avons aussi montré que pour la spécificité de cette interaction la présence de la partie peptidique du peptidoglycane était importante. Nous avons mis en évidence 13 résidus potentiellement importants pour cette interaction. En tenant compte de ces résidus ainsi que des spécificités du domaine AMIN, 41 mutants ont été réalisés. Parmi ces protéines mutées, 27 ont été purifiées et 12 d'entre elles se sont avérées insolubles. Onze des 15 protéines solubles ont pu être testées en co-précipitation avec le peptidoglycane mais elles ont toutes interagi avec ce dernier. Afin d'affiner notre caractérisation des protéines mutantes, nous avons réalisé une construction permettant leur fusion à la sfGFP pour réaliser des localisations *in vivo* qui sont actuellement en cours.

VI. Bibliographie

- Aaron, M., Charbon, G., Lam, H., Schwarz, H., Vollmer, W., and Jacobs-Wagner, C. (2007) The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **64**: 938–52.
- Aarsman, M.E.G., Piette, A., Fraipont, C., Vinkenvleugel, T.M.F., Nguyen-Distèche, M., and Blaauwen, T. Den (2005) Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol* **55**: 1631–1645.
- Adams, D.W., and Errington, J. (2009) Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* **7**: 642–653.
- Addinall, S.G., Cao, C., and Lutkenhaus, J. (1997) FtsN, a late recruit to the septum in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **25**: 303–309.
- Alcorlo, M., Martínez-Caballero, S., Molina, R., and Hermoso, J.A. (2017) Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* **44**: 87–100.
- Alexeeva, S., Gadella, T.W.J., Verheul, J., Verhoeven, G.S., and Blaauwen, T. Den (2010) Direct interactions of early and late assembling division proteins in *Escherichia coli* cells resolved by FRET. *Mol Microbiol* **77**: 384–398.
- Arbeloa, A., Hugonnet, J.E., Sentilhes, A.C., Josseaume, N., Dubost, L., Monsempes, C., Blanot, D., Brouard, J.P., and Arthur, M. (2004) Synthesis of mosaic peptidoglycan cross-bridges by hybrid peptidoglycan assembly pathways in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **279**: 41546–41556.
- Arends, S.J.R., Kustus, R.J., and Weiss, D.S. (2009) ATP-binding site lesions in FtsE impair cell division. *J Bacteriol* **191**: 3772–3784.
- Aussel, L., Barre, F.X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D. (2002) FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* **108**: 195–205.
- Bailey, M.W., Bisicchia, P., Warren, B.T., Sherratt, D.J., and Männik, J. (2014) Evidence for divisome localization mechanisms independent of the Min system and SlmA in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **10**: e1004504.
- Banzhaf, M., Berg van Saparoea, B. van den, Terrak, M., Fraipont, C., Egan, A., Philippe, J., Zapun, A., Breukink, E., Nguyen-Distèche, M., den Blaauwen, T., and Vollmer, W. (2012) Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol* **85**: 179–194.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 168–207.
- Barrett, D., Wang, T.S.A., Yuan, Y., Zhang, Y., Kahne, D., and Walker, S. (2007) Analysis of glycanpolymers produced by peptidoglycan glycosyltransferases. *J Biol Chem* **282**: 31964–31971.
- Bartual, S.G., Straume, D., Stamsås, G.A., Muñoz, I.G., Alfonso, C., Martínez-Ripoll, M., Håvarstein, L., and Hermoso, J.A. (2014) Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* **5**: 3842.
- Bendezú, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., and Boer, P.A.J. De (2009) RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *EMBO J* **28**: 193–204.
- Bernard, E., Rolain, T., Courtin, P., Guillot, A., Langella, P., Hols, P., and Chapot-Chartier, M.P. (2011) Characterization of O-acetylation of N-acetylglucosamine: A novel structural variation of bacterial

peptidoglycan. *J Biol Chem* **286**: 23950–23958.

Bernhardt, T.G., and Boer, P.A.J. De (2003) The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* **48**: 1171–1182.

Bertsche, U., Breukink, E., Kast, T., and Vollmer, W. (2005) *In vitro* murein (peptidoglycan) synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 38096–38101.

Bertsche, U., Kast, T., Wolf, B., Fraipont, C., Aarsman, M.E.G., Kannenberg, K., Von Rechenberg, M., Nguyen-Distèche, M., Den Blaauwen, T., Höltje, J.V., and Vollmer, W. (2006) Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**: 675–690.

Biboy, J., Bui, N.K., and Vollmer, W. (2013) *In vitro* peptidoglycan synthesis assay with lipid II substrate. *Methods Mol Biol* **966**: 273–88.

Billaudeau, C., Chastanet, A., Yao, Z., Cornilleau, C., Mirouze, N., Fromion, V., and Carballido-López, R. (2017) Contrasting mechanisms of growth in two model rod-shaped bacteria. *Nat Commun* **8**: 15370.

Bisson-Filho, A.W., Hsu, Y.P., Squyres, G.R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V. and Garner, E.C. (2017) Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science (80-)* **355**: 739–743.

Blair, K.M., Mears, K.S., Taylor, J.A., Fero, J., Jones, L.A., Gafken, P.R., Whitney, J.C., and Salama, N.R. (2018) The *Helicobacter pylori* cell shape promoting protein Csd5 interacts with the cell wall, MurF, and the bacterial cytoskeleton. *Mol Microbiol* **0-3**

Bolla, J.R., Sauer, J.B., Wu, D., Mehmood, S., Allison, T.M., and Robinson, C. V. (2018) Direct observation of the influence of cardiolipin and antibiotics on lipid II binding to MurJ. *Nat Chem* **10**: 363–371.

Bonis, M., Ecobichon, C., Guadagnini, S., Prévost, M.C., and Boneca, I.G. (2010) A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence. *Mol Microbiol* **78**: 809–819.

Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., and Mengin-Lecreulx, D. (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 208–233.

Breukink, E., Heusden, H.E. Van, Vollmerhaus, P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., Heck, A.J.R., and De Kruijff, B. (2003) Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem* **278**: 19898–19903.

Brown, P.J.B., Pedro, M.A. de, Kysela, D.T., Henst, C. Van der, Kim, J., Bolle, X. De, Fuqua, C., and Brun, Y.V. (2012) Polar growth in the Alphaproteobacterial order Rhizobiales. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 1697–701.

Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2004) A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* **52**: 1315–1327.

Buist, G., Steen, A., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2008) LysM, a widely distributed protein motif for binding to peptidoglycans. *Mol Microbiol* **68**: 838–847.

Busiek, K.K., and Margolin, W. (2014) A role for FtsA in SPOR-independent localization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *Mol Microbiol* **92**: 1212–1226.

Busiek, K.K., Eraso, J.M., Wang, Y., and Margolin, W. (2012) The Early Divisome Protein FtsA Interacts

Directly through Its 1c: Subdomain with the Cytoplasmic Domain of the Late Divisome: Protein FtsN. *J Bacteriol* **194**: 1989–2000.

Buss, J., Coltharp, C., Shtengel, G., Yang, X., Hess, H., and Xiao, J. (2015) A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics. *PLoS Genet* **11**: e1005128.

Butler, E.K., Davis, R.M., Bari, V., Nicholson, P.A., and Ruiz, N. (2013) Structure-function analysis of MurJ reveals a solvent-exposed cavity containing residues essential for peptidoglycan biogenesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**: 4639–4649.

Butler, E.K., Tan, W.B., Joseph, H., and Ruiz, N. (2014) Charge requirements of lipid II flippase activity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **196**: 4111–4119.

Cabeen, M.T., Charbon, G., Vollmer, W., Born, P., Ausmees, N., Weibel, D.B., and Jacobs-Wagner, C. (2009) Bacterial cell curvature through mechanical control of cell growth. *EMBO J* **28**: 1208–1219.

Cabeen, M.T., Murolo, M.A., Briegel, A., Bui, N.K., Vollmer, W., Ausmees, N., Jensen, G.J. and Jacobs-Wagner, C. (2010) Mutations in the lipopolysaccharide biosynthesis pathway interfere with crescentin-mediated cell curvature in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **192**: 3368–3378.

Cameron, T.A., Anderson-Furgeson, J., Zupan, J.R., Zik, J.J., and Zambryski, P.C. (2014) Peptidoglycan synthesis machinery in *Agrobacterium tumefaciens* during unipolar growth and cell division. *MBio* **5**: e01219-14.

Cascales, E., and Llobès, R. (2004) Deletion analyses of the peptidoglycan-associated lipoprotein Pal reveals three independent binding sequences including a TolA box. *Mol Microbiol* **51**: 873–885.

Cascales, E., Gavioli, M., Sturgis, J.N., and Llobes, R. (2000) Proton motive force drives the interaction of the inner membrane TolA and outer membrane Pal proteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**: 904–915.

Chan, A.C.K., Blair, K.M., Liu, Y., Frirdich, E., Gaynor, E.C., Tanner, M.E., Salama, N.R., and Murphy, M.E.P. (2015) Helical shape of *Helicobacter pylori* requires an atypical glutamine as a zinc ligand in the carboxypeptidase *csd4*. *J Biol Chem* **290**: 3622–3638.

Chaptal, V., Delolme, F., Kilburg, A., Magnard, S., Montigny, C., Picard, M., Prier, C., Monticelli, L., Bornert, O., Agez, M. Ravaud, S., Orelle, C., Wagner, R., Jawhari, A., Broutin, I., Pebay-Peyroula, E., Jault, J.M., Kaback, H.R, le Maire, M., and Falson, P. (2017) Quantification of Detergents Complexed with Membrane Proteins. *Sci Rep* **7**: 41751.

Chen, J.C., Minev, M., and Beckwith, J. (2002) Analysis of *ftsQ* mutant alleles in *Escherichia coli*: Complementation, septal localization, and recruitment of downstream cell division proteins. *J Bacteriol* **184**: 695–705.

Chen, Y., and Erickson, H.P. (2005) Rapid *in vitro* assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* **280**: 22549–22554.

Cho, H., Wivagg, C.N., Kapoor, M., Barry, Z., Rohs, P.D.A., Suh, H., Marto, J.A., Garner, E.C. and Bernhardt, T.G. (2016) Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously. *Nat Microbiol* **1**: 16172.

Clarke, a.J., and Dupont, C. (1992) O-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis. *Can J Microbiol* **38**: 85–91.

Cohen, D.N., Sham, Y.Y., Haugstad, G.D., Xiang, Y., Rossmann, M.G., Anderson, D.L., and Popham, D.L.

- (2009) Shared Catalysis in Virus Entry and Bacterial Cell Wall Depolymerization. *J Mol Biol* **387**: 607–618.
- Condon, S.G.F., Mahbuba, D. Al, Armstrong, C.R., Diaz-Vazquez, G., Craven, S.J., LaPointe, L.M., Khadria, A.S., Chadda, R., Crooks, J.A., Rangarajan, N., Weibel, D.B., Hoskins, A.A., Robertson, J.L., Cui, Q., and Senes, A. (2018) The FtsLB subcomplex of the bacterial divisome is a tetramer with an uninterrupted FtsL helix linking the transmembrane and periplasmic regions. *J Biol Chem* **293**: 1623–1641.
- Contreras-Martel, C., Martins, A., Ecobichon, C., Trindade, D.M., Matteï, P.-J., Hicham, S., Hardouin, P., El Ghachi, M., Boneca, I.G. and Dessen, A. (2017) Molecular architecture of the PBP2-MreC core bacterial cell wall synthesis complex. *Nat Commun* **8**: 776.
- Corbin, B.D., Geissler, B., Sadasivam, M., and Margolin, W. (2004) Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J Bacteriol* **186**: 7736–7744.
- Corbin, B.D., Wang, Y., Beuria, T.K., and Margolin, W. (2007) Interaction between cell division proteins FtsE and FtsZ. *J Bacteriol* **189**: 3026–3035.
- Crasson, O., Courtade, G., Léonard, R.R., Aachmann, F.L., Legrand, F., Parente, R., Baurain, D., Galleni, M., Sørli, M., and Vandevenne, M. (2017) Human Chitotriosidase: Catalytic Domain or Carbohydrate Binding Module, Who's Leading HCHT's Biological Function. *Sci Rep* **7**: 2768.
- D'Ulisse, V., Fagioli, M., Ghelardini, P., and Paolozzi, L. (2007) Three functional subdomains of the *Escherichia coli* FtsQ protein are involved in its interaction with the other division proteins. *Microbiology* **153**: 124–138.
- Dai, K., Xu, Y., and Lutkenhaus, J. (1996) Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsN. *J Bacteriol* **178**: 1328–34.
- Dajkovic, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J., and Wirtz, D. (2010) Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol Microbiol* **78**: 651–668.
- Daniel, R.A., and Errington, J. (2003) Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**: 767–776.
- Datta, S., Costantino, N., and Court, D.L. (2006) A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene* **379**: 109–115.
- de Boer, P.A.J. (2010) Advances in understanding *E. coli* cell fission. *Curr Opin Microbiol* **13**: 730–737.
- den Blaauwen, T., Hamoen, L.W., and Levin, P.A. (2017) The divisome at 25: the road ahead. *Curr Opin Microbiol* **36**: 85–94.
- Denome, S.A., Elf, P.K., Henderson, T.A., Nelson, D.E., and Young, K.D. (1999) *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: Viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol* **181**: 3981–3993.
- Derouaux, A., Sauvage, E., and Terrak, M. (2013) Peptidoglycan glycosyltransferase substrate mimics as templates for the design of new antibacterial drugs. *Front Immunol* **4**: 78.
- Derouaux, A., Terrak, M., Blaauwen, T. den, and Vollmer, W. (2013) Bacterial Cell Wall Growth, Shape and Division. *Bact Membr Struct Mol Biol* **3**–54.
- Di Berardino, M., Dijkstra, A., Stüber, D., Keck, W., and Gubler, M. (1996) The monofunctional

- glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. Overexpression and determination of the glycan-polymerising activity. *FEBS Lett* **392**: 184–188.
- Di Lallo, G., Fagioli, M., Barionovi, D., Ghelardini, P., and Paolozzi, L. (2003) Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: Bacterial septosome differentiation. *Microbiology* **149**: 3353–3359.
- Di Ventura, B., Knecht, B., Andreas, H., Godinez, W.J., Fritsche, M., Rohr, K., Nickel, W., Heermann, D.W. and Sourjik, V. (2013) Chromosome segregation by the *Escherichia coli* Min system. *Mol Syst Biol* **9**: 686.
- Domínguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Söldner, R., and Carballido-López, R. (2011) Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**: 225–8.
- Dorazi, R., and Dewar, S.J. (2000) The SOS promoter *dinH* is essential for *ftsK* transcription during cell division. *Microbiology* **146**: 2891–2899.
- Du, S., Park, K.T., and Lutkenhaus, J. (2015) Oligomerization of FtsZ converts the FtsZ tail motif (conserved carboxy-terminal peptide) into a multivalent ligand with high avidity for partners ZipA and SlmA. *Mol Microbiol* **95**: 173–188.
- Du, S., Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2016) FtsEX acts on FtsA to regulate divisome assembly and activity. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E5052–E5061.
- Dubarry, N., and Barre, F.X. (2010) Fully efficient chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J* **29**: 597–605.
- Ducan, T.R. (2011) *Site-directed mutagenesis of the SPOR domain from Escherichia Coli FtsN*. Ph.D. Thesis. University of Iowa
- Dupaigne, P., Tonthat, N.K., Espéli, O., Whitfill, T., Boccard, F., and Schumacher, M.A. (2012) Molecular Basis for a Protein-Mediated DNA-Bridging Mechanism that Functions in Condensation of the *E. coli* Chromosome. *Mol Cell* **48**: 560–571.
- Durand-Heredia, J., Rivkin, E., Fan, G., Morales, J., and Janakiraman, A. (2012) Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**: 3189–3198.
- Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2013) The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci* **1277**: 8–28.
- Egan, A.J.F., and Vollmer, W. (2016) Continuous fluorescence assay for peptidoglycan glycosyltransferases. In *Methods in Molecular Biology*. pp. 171–184.
- Egan, A.J.F., Biboy, J., van't Veer, I., Breukink, E., and Vollmer, W. (2015) Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**.
- Egan, A.J.F., Jean, N.L., Koumoutsi, A., Bougault, C.M., Biboy, J., Sassine, J., Solovyova, A.S., Breukink, E., Typas, A., Vollmer, W., and Simorre, J.P. (2014) Outer-membrane lipoprotein LpoB spans the periplasm to stimulate the peptidoglycan synthase PBP1B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 8197–202.
- Eiamphungporn, W., and Helmann, J.D. (2008) The *Bacillus subtilis* σ^M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol Microbiol* **67**: 830–848.
- El Ghachi, M., Matteï, P.J., Ecobichon, C., Martins, A., Hoos, S., Schmitt, C., Colland, F., Ebel, C., Prévost,

- M.C., Gabel, F., England, P., Dessen, A., and Boneca, I.G. (2011) Characterization of the elongasome core PBP2:MreC complex of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **82**: 68–86.
- Emami, K., Guyet, A., Kawai, Y., Devi, J., Wu, L.J., Allenby, N., Daniel, R.A., and Errington, J. (2017) RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nat Microbiol* **2**: 16253.
- Erickson, H.P. (2009) Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 9238–9243.
- Erickson, H.P., Anderson, D.E., and Osawa, M. (2010) FtsZ in Bacterial Cytokinesis: Cytoskeleton and Force Generator All in One. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 504–528.
- Errington, J. (2017) Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. *Biochem Soc Trans* **45**: 287–295.
- Errington, J., Mickiewicz, K., Kawai, Y., and Wu, L.J. (2016) L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **371**.
- Espeli, O., Borne, R., Dupaigne, P., Thiel, A., Gigant, E., Mercier, R., and Bocard, F. (2012) A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J* **31**: 3198–3211.
- Favier, A., and Brutscher, B. (2011) Recovering lost magnetization: Polarization enhancement in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* **49**: 9–15.
- Fay, A., and Dworkin, J. (2009) *Bacillus subtilis* homologs of MviN (MurJ), the putative *Escherichia coli* lipid II flippase, are not essential for growth. *J Bacteriol* **191**: 6020–6028.
- Fenton, A.K., and Gerdes, K. (2013) Direct interaction of FtsZ and MreB is required for septum synthesis and cell division in *Escherichia coli*. *EMBO J* **32**: 1953–1965.
- Fibriansah, G., Gliubich, F.I., and Thunnissen, A.M.W.H. (2012) On the mechanism of peptidoglycan binding and cleavage by the endo-specific lytic transglycosylase MltE from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **51**: 9164–9177.
- Firczuk, M., and Bochtler, M. (2007) Mutational analysis of peptidoglycan amidase MepA. *Biochemistry* **46**: 120–128.
- Fiuza, M., Letek, M., Leiba, J., Villadangos, A.F., Vaquera, J., Zanella-Cléon, I., Mateos, L.M., Molle, V., and Gil, J.A. (2010) Phosphorylation of a novel cytoskeletal protein (RsmP) regulates rod-shaped morphology in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **285**: 29387–29397.
- Flårdh, K. (2010) Cell polarity and the control of apical growth in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol* **13**: 758–765.
- Fraipont, C., Alexeeva, S., Wolf, B., Ploeg, R. Der, Schloesser, M., Blaauwen, T. Den, and Nguyen-Distèche, M. (2011) The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*. *Microbiology* **157**: 251–259.
- Fujita, J., Maeda, Y., Nagao, C., Tsuchiya, Y., Miyazaki, Y., Hirose, M., Mizohata, E., Matsumoto, Y., Inoue, T., Mizuguchi, K., and Matsumura, H. (2014) Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* **588**: 1879–1885.
- Gallagher, S.R. (2001) One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. *Curr Protoc protein Sci* **Chapter 10**: Unit 10.3.

- Galli, E., and Gerdes, K. (2012) FtsZ-ZapA-ZapB interactome of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**: 292–302.
- Gamba, P., Veening, J.W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W., and Daniel, R.A. (2009) Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* **191**: 4186–4194.
- Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D.Z., and Mitchison, T. (2011) Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science (80-)* **333**: 222–225.
- Gerding, D.N. (2001) The search for good antimicrobial stewardship. *Jt Comm J Qual Improv* **27**: 403–404.
- Gerding, M.A., Liu, B., Bendezú, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., and Boer, P.A.J. De (2009) Self-enhanced accumulation of FtsN at division sites and roles for other proteins with a SPOR domain (DamX, DedD, and RlpA) in *Escherichia coli* cell constriction. *J Bacteriol* **191**: 7383–7401.
- Gerding, M.A., Ogata, Y., Pecora, N.D., Niki, H., and Boer, P.A.J. De (2007) The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol Microbiol* **63**: 1008–1025.
- Gill, D.R., and Salmond, G.P.C. (1987) The *Escherichia coli* cell division proteins FtsY, FtsE and FtsX are inner membrane-associated. *MGG Mol Gen Genet* **210**: 504–508.
- Glas, M., Bart Van Den Berg Van Saparoea, H., McLaughlin, S.H., Roseboom, W., Liu, F., Koningstein, G.M., Fish, A., Den Blaauwen, T., Heck, A.J.R., De Jong, L., Bitter, W., De Esch, I.J.P., and Luirink, J. (2015) The soluble periplasmic domains of *Escherichia coli* cell division proteins FtsQ/FtsB/FtsL form a trimeric complex with submicromolar affinity. *J Biol Chem* **290**: 21498–21509.
- Glauner, B., and Holtje, J. V. (1990) Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**: 18988–18996.
- Glauner, B., Holtje, J. V., and Schwarz, U. (1988) The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 10088–10095.
- Goehring, N.W., Robichon, C., and Beckwith, J. (2007) Role for the non essential N terminus of FtsN in divisome assembly. *J Bacteriol* **189**: 646–649.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.-M. (1998) Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1079–1093.
- Goffin, C., Fraipont, C., Ayala, J., Terrak, M., Nguyen-Distèche, M., and Ghuysen, J.M. (1996) The non-penicillin-binding module of the tripartite penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* is required for folding and/or stability of the penicillin-binding module and the membrane-anchoring module confers cell septation activity on the folded . *J Bacteriol* **178**: 5402–5409.
- Goldstein, S.F., Charon, N.W., and Kreiling, J.A. (1994) *Borrelia burgdorferi* swims with a planar waveform similar to that of eukaryotic flagella. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 3433–3437.
- Goley, E.D., Comolli, L.R., Fero, K.E., Downing, K.H., and Shapiro, L. (2010) DipM links peptidoglycan remodelling to outer membrane organization in *Caulobacter*. *Mol Microbiol* **77**: 56–73.
- Goley, E.D., Yeh, Y.C., Hong, S.H., Fero, M.J., Abeliuk, E., Mcadams, H.H., and Shapiro, L. (2011) Assembly of the *Caulobacter* cell division machine. *Mol Microbiol* **80**: 1680–1698.
- González-Leiza, S.M., Pedro, M.A. de, and Ayala, J.A. (2011) Amph, a bifunctional DD-endopeptidase

- and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **193**: 6887–6894.
- Goodell, E.W. (1985) Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **163**: 305–310.
- Grangeon, R., Zupan, J.R., Anderson-Furgeson, J., and Zambryski, P.C. (2015) PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 11666–71.
- Gray, A.N., Egan, A.J.F., Van't Veer, I.L., Verheul, J., Colavin, A., Koumoutsis, A., Biboy, J., Altelaar, A.F.M., Damen, M. J., Huang, K.C., Simorre, J.P., Breukink, E., Den Blaauwen, T., Typas, A., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2015) Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. *Elife* **4**.
- Grenga, L., Luzi, G., Paolozzi, L., and Ghelardini, P. (2008) The *Escherichia coli* FtsK functional domains involved in its interaction with its divisome protein partners. *FEMS Microbiol Lett* **287**: 163–167.
- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev* **16**: 2544–2556.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J Bacteriol* **177**: 4121–4130.
- Haeusser, D.P., and Margolin, W. (2016) Splitsville: Structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat Rev Microbiol* **14**: 305–319.
- Hale, C.A., and Boer, P.A.J. De (1997) Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. *Cell* **88**: 175–185.
- Hale, C.A., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T.G., Margolin, W., Niki, H., and Boer, P.A.J. De (2011) Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. *J Bacteriol* **193**: 1393–1404.
- Haney, S.A., Glasfeld, E., Hale, C., Keeney, D., He, Z., and Boer, P. De (2001) Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ-ZipA interaction in the yeast two-hybrid system. Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. *J Biol Chem* **276**: 11980–11987.
- Harz, H., Burgdorf, K., and Höltje, J.V. (1990) Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **190**: 120–128.
- Hayhurst, E.J., Kailas, L., Hobbs, J.K., and Foster, S.J. (2008) Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 14603–14608.
- Heichlinger, A., Ammelburg, M., Kleinschnitz, E.M., Latus, A., Maldener, I., Flärdh, K., Wohlleben, W., and Muth, G. (2011) The MreB-like protein Mbl of *Streptomyces coelicolor* A3(2) depends on MreB for proper localization and contributes to spore wall synthesis. *J Bacteriol* **193**: 1533–1542.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., De Pedro, M.A., and Höltje, J.V. (2001) Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 167–178.
- Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., and Höltje, 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.
- Helmann, J.D. (2002) The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**: 47–.

- Hempel, A.M., Wang, S., Letek, M., Gil, J.A., and Flärdh, K. (2008) Assemblies of DivIVA mark sites for hyphal branching and can establish new zones of cell wall growth in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 7579–83.
- Holtje, J. V (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 181–203.
- Höltje, J. V, Kopp, U., Ursinus, A., and Wiedemann, B. (1994) The negative regulator of beta-lactamase induction AmpD is a N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiol Lett* **122**: 159–64.
- Höltje, J. V, Mirelman, D., Sharon, N., and Schwarz, U. (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **124**: 1067–76.
- Holtje, J.-V., and Tuomanen, E.I. (1991) The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections *in vivo*. *J Microbiol* **137**: 441–454.
- Howell, M.L., Aliashkevich, A., Sundararajan, K., Daniel, J.J., Lariviere, P.J., Goley, E., Cava, F. and Brown, P.J.B. (2018) *Agrobacterium tumefaciens* divisome proteins regulate the transition from polar growth to cell division. *bioRxiv* <http://biorxiv.org/content/early/2018/09/10/412759.1.abstract>.
- Hu, Z., and Lutkenhaus, J. (2003) A conserved sequence at the C-terminus of MinD is required for binding to the membrane and targeting MinC to the septum. *Mol Microbiol* **47**: 345–55.
- Hu, Z., Mukherjee, A., Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 14819–14824.
- Huang, K.H., Durand-Heredia, J., and Janakiraman, A. (2013) FtsZ ring stability: Of bundles, tubules, crosslinks, and curves. *J Bacteriol* **195**: 1859–1868.
- Hugonnet, J.-E., Mengin-Lecreulx, D., Monton, A., Blaauwen, T. den, Carbonnelle, E., Veckerlé, C., Brun, Y.V., Van Nieuwenhze, M., Bouchier, C., Tu, K., Rice, L.B., and Arthur, M. (2016) Factors essential for L,D-transpeptidase-mediated peptidoglycan cross-linking and β -lactam resistance in *Escherichia coli*. *Elife* **5**.
- Imoto, Y., Yoshida, Y., Yagisawa, F., Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2011) The cell cycle, including the mitotic cycle and organelle division cycles, as revealed by cytological observations. *J Electron Microsc (Tokyo)* **60 Suppl 1**: S117-36.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23–28.
- Ishino, F., Hai Kwan Jung, Ikeda, M., Doi, M., Wachi, M., and Matsushashi, M. (1989) New mutations fts-36, Its-33, and ftsW clustered in the mra region of the *Escherichia coli* chromosome induce thermosensitive cell growth and division. *J Bacteriol* **171**: 5523–5530.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., and 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.
- Jacobs, C., Huang, L.J., Bartowsky, E., Normark, S., and Park, J.T. (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *EMBO J* **13**: 4684–4694.
- Jacobs, C., Joris, B., Jamin, M., Klarsov, K., Beeumen, J. van, Mengin-Lecreulx, D., Park, D., Van Heijenoort, J., Jean, T., Normark, S., and Frère, J.M. (1995) AmpD, essential for both β -lactamase

- regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *Mol Microbiol* **15**: 553–559.
- Jones, L.J.F., Carballido-López, R., and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913–922.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **66**: 125–132.
- Karamanos, Y. (1997) Endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidases and their potential substrates: Structure/function relationships. *Res Microbiol* **148**: 661–671.
- Karimova, G., Dautin, N., and 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.
- Kawai, Y., Asai, K., and Errington, J. (2009) Partial functional redundancy of MreB isoforms, MreB, Mbl and MreBHp in cell morphogenesis of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **73**: 719–731.
- Kerff, F., Petrella, S., Mercier, F., Sauvage, E., Herman, R., Pennartz, A., Zervosen, A., Luxen, A., Frère, J.M., Joris, B., and Charlier, P. (2010) Specific Structural Features of the N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase AmiD from *Escherichia coli* and Mechanistic Implications for Enzymes of This Family. *J Mol Biol* **397**: 249–259.
- Khadria, A., and Senes, A. (2013) Measurement of transmembrane peptide interactions in liposomes using Förster resonance energy transfer (FRET). *Methods Mol Biol* **1063**: 19–36.
- Khattar, M.M., Begg, K.J., and Donachie, W.D. (1994) Identification of FtsW and characterization of a new ftsW division mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 7140–7147.
- Kim, H.S., Im, H.N., An, D.R., Yoon, J.Y., Jang, J.Y., Mobashery, S., Heseck, D., Lee, M., Yoo, J., Cui, M., Choi, S., Kim, C., Lee, N.K., Kim, S.J., Kim, J.Y., Bang, G., Han, B.W., Lee, B.I., Yoon, H.J., and Suh, S.W. (2015) The cell shape-determining Csd6 protein from *Helicobacter pylori* constitutes a new family of L, D-carboxypeptidase. *J Biol Chem* **290**: 25103–25117.
- Koch, A.L. (1998) Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**: 689–701.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J., and Gerdes, K. (2005) The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol* **55**: 78–89.
- Kühn, J., Briegel, A., Mörschel, E., Kahnt, J., Leser, K., Wick, S., Jensen, G.J., and Thanbichler, M. (2010) Bactofilins, a ubiquitous class of cytoskeletal proteins mediating polar localization of a cell wall synthase in *Caulobacter crescentus*. *EMBO J* **29**: 327–39.
- Kuk, A.C.Y., Mashalidis, E.H., and Lee, S.Y. (2017) Crystal structure of the MOP flippase MurJ in an inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol* **24**: 171–176.
- Lan, G., Daniels, B.R., Dobrowsky, T.M., Wirtz, D., and Sun, S.X. (2009) Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 121–126.
- Lara, B., and Ayala, J.A. (2002) Topological characterization of the essential *Escherichia coli* cell division protein FtsW. *FEMS Microbiol Lett* **216**: 23–32.
- Lavollay, M., Arthur, M., Fourgeaud, M., Dubost, L., Marie, A., Veziris, N., Blanot, D., Gutmann, L., and Mainardi, J.L. (2008) The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. *J Bacteriol* **190**: 4360–4366.

- Lavollay, M., Fourgeaud, M., Herrmann, J.L., Dubost, L., Marie, A., Gutmann, L., Arthur, M., and Mainardi, J.L. (2011) The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases. *J Bacteriol* **193**: 778–782.
- Leclercq, S. (2013). *Purification des protéines membranaires FtsW et PBP3 d'E.coli et étude de leur effet sur la synthèse du peptidoglycane*. Master thesis. Université de Liège
- Lee, T.K., Meng, K., Shi, H., and Huang, K.C. (2016) Single-molecule imaging reveals modulation of cell wall synthesis dynamics in live bacterial cells. *Nat Commun* **7**: 13170.
- Leeuw, E. De, Graham, B., Phillips, G.J., Hagen-Jongman, C.M. Ten, Oudega, B., and Luirink, J. (1999) Molecular characterization of *Escherichia coli* FtsE and FtsX. *Mol Microbiol* **31**: 983–993.
- Li, Y., Hsin, J., Zhao, L., Cheng, Y., Shang, W., Huang, K.C., Wang, H. W. and Ye, S. (2013) FtsZ protofilaments use a hinge-opening mechanism for constrictive force generation. *Science (80-)* **341**: 392–395.
- Liechti, G., Kuru, E., Packiam, M., Hsu, Y.-P., Tekkam, S., Hall, E., Rittichier, J.T., VanNieuwenhze, M., Brun, Y.V., and Maurelli, A.T. (2016) Pathogenic Chlamydia Lack a Classical Sacculus but Synthesize a Narrow, Mid-cell Peptidoglycan Ring, Regulated by MreB, for Cell Division. *PLoS Pathog* **12**: e1005590.
- Liepinsh, E., Génereux, C., Dehareng, D., Joris, B., and Otting, G. (2003) NMR structure of *Citrobacter freundii* AmpD, comparison with bacteriophage T7 lysozyme and homology with PGRP domains. *J Mol Biol* **327**: 833–842.
- Liu, B., Persons, L., Lee, L., and Boer, P.A.J. de (2015) Roles for both FtsA and the FtsBLQ subcomplex in FtsN-stimulated cell constriction in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **95**: 945–970.
- Liu, X., Meiresonne, N.Y., Bouhss, A., and Blaauwen, T. den (2017) The Combined activities of FtsW and MurJ are required for lipid II translocation during cell division in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **109**: 855–884.
- Lovering, A.L., Castro, L.H. De, Lim, D., and Strynadka, N.C.J. (2007) Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science (80-)* **315**: 1402–1405.
- Löwe, J., and Amos, L.A. (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203–6 .
- Lu, C., Reedy, M., and Erickson, H.P. (2000) Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol* **182**: 164–170.
- Lu, J.Z., Fujiwara, T., Komatsuzawa, H., Sugai, M., and Sakon, J. (2006) Cell wall-targeting domain of glycyglycine endopeptidase distinguishes among peptidoglycan cross-bridges. *J Biol Chem* **281**: 549–558.
- Lutkenhaus, J. (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* **76**: 539–62.
- Lutkenhaus, J. (2009) FtsN - Trigger for septation. *J Bacteriol* .
- Lutkenhaus, J., and Du, S. (2017) *E. coli* Cell Cycle Machinery. *Subcell Biochem* **84**: 27–65.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., and Du, S. (2012) Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton* **69**: 778–790.
- Ma, X., and Margolin, W. (1999) Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core

domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol* **181**: 7531–7544.

Mainardi, J.-L., Villet, R., Bugg, T.D., Mayer, C., and Arthur, M. (2008) Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 386–408.

Mannik, J., Wu, F., Hol, F.J.H., Bisicchia, P., Sherratt, D.J., Keymer, J.E., and Dekker, C. (2012) Robustness and accuracy of cell division in *Escherichia coli* in diverse cell shapes. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 6957–6962.

Margolin, W. (2009) Sculpting the bacterial cell. *Curr Biol* **19**: R812–22.

Marrec-Fairley, M., Piette, A., Gallet, X., Basseur, R., Hara, H., Fraipont, C., Ghuysen, J.M., and Nguyen-Distèche, M. (2000) Differential functionalities of amphiphilic peptide segments of the cell-septation penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **37**: 1019–1031.

Mascher, T., Hachmann, A.B., and Helmann, J.D. (2007) Regulatory overlap and functional redundancy among *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function sigma factors. *J Bacteriol* **189**: 6919–6927.

Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., and Tanaka, I. (2012) Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **68**: 1175–1188.

Matsumoto, S., Shimada, A., Nyirenda, J., Igura, M., Kawano, Y., and Kohda, D. (2013) Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 17868–17873.

Matsuzawa, H., Asoh, S., Kunai, K., Muraiso, K., Takasuga, A., and Ohta, T. (1989) Nucleotide sequence of the rodA gene, responsible for the rod shape of *Escherichia coli*: rodA and the pbpA gene, encoding penicillin-binding protein 2, constitute the rodA operon. *J Bacteriol* **171**: 558–560.

McCoy, A.J. (2006) Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. In *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. pp. 32–41.

McPherson, D.C., and Popham, D.L. (2003) Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 1423–31.

Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2016) SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* **537**: 634–638.

Meeske, A.J., Rodrigues, C.D.A., Brady, J., Lim, H.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2016) High-Throughput Genetic Screens Identify a Large and Diverse Collection of New Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol* **14**: e1002341.

Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C. a, Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2015) MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 6437–42.

Mercier, R., Petit, M.A., Schbath, S., Robin, S., Karoui, M. El, Boccard, F., and Espéli, O. (2008) The MatP/matS Site-Specific System Organizes the Terminus Region of the *E. coli* Chromosome into a Macrodomain. *Cell* **135**: 475–485.

Merlin, C., Masters, M., McAteer, S., and Coulson, A. (2003) Why Is Carbonic Anhydrase Essential to *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **185**: 6415–6424.

- Miroux, B., and Walker, J.E. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**: 289–98.
- Mistry, B. V., Sol, R. Del, Wright, C., Findlay, K., and Dyson, P. (2008) FtsW is a dispensable cell division protein required for Z-ring stabilization during sporulation septation in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 5555–5566.
- Mohammadi, T., Dam, V. van, Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., De Kruijff, B., and Breukink, E. (2011) Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* **30**: 1425–1432.
- Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., and Blaauwen, T. Den (2007) The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **65**: 1106–1121.
- Mohammadi, T., Ploeger, G.E.J., Verheul, J., Comvalius, A.D., Martos, A., Alfonso, C., Van Marle, J., Rivas, G., and den Blaauwen, T. (2009) The GTPase activity of *Escherichia coli* FtsZ determines the magnitude of the FtsZ polymer bundling by ZapA *in vitro*. *Biochemistry* **48**: 11056–11066.
- Mohammadi, T., Sijbrandi, R., Lutters, M., Verheul, J., Martin, N.I., Blaauwen, T. Den, De Kruijff, B., and Breukink, E. (2014) Specificity of the transport of lipid II by FtsW in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **289**: 14707–14718.
- Möll, A., and Thanbichler, M. (2009) FtsN-like proteins are conserved components of the cell division machinery in proteobacteria. *Mol Microbiol* **72**: 1037–1053.
- Möll, A., Schlimpert, S., Briegel, A., Jensen, G.J., and Thanbichler, M. (2010) DipM, a new factor required for peptidoglycan remodelling during cell division in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **77**: 90–107.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003) Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol* **50**: 845–55.
- Mukherjee, A., and Lutkenhaus, J. (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J* **17**: 462–469.
- Müller, P., Ewers, C., Bertsche, U., Anstett, M., Kallis, T., Breukink, E., Fraipont, C., Terrak, M., Nguyen-Distèche, M., and Vollmer, W. (2007) The essential cell division protein FtsN interacts with the murein (peptidoglycan) synthase PBP1B in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **282**: 36394–36402.
- Narita, S., and Tokuda, H. (2006) An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Lett* **580**: 1164–70.
- Natale, P., Pazos, M., and Vicente, M. (2013) The *Escherichia coli* divisome: Born to divide. *Environ Microbiol* **15**: 3169–3182.
- Nelson, D.E., and Young, K.D. (2001) Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 3055–3064.
- Nguyen-Distèche, M., Fraipont, C., Buddelmeijer, N., and Nanninga, N. (1998) The structure and function of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 3. *Cell Mol Life Sci C* **54**: 309–316.

- Niki, H., Yamaichi, Y., and Hiraga, S. (2000) Dynamic organization of chromosomal DNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **14**: 212–223.
- Normark, S., Boman, H.G., and Matsson, E. (1969) Mutant of *Escherichia coli* with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. *J Bacteriol* **97**: 1334–1342.
- Oliva, M.A., Trambaiolo, D., and Löwe, J. (2007) Structural Insights into the Conformational Variability of FtsZ. *J Mol Biol* **373**: 1229–1242.
- Osawa, M., Anderson, D.E., and Erickson, H.P. (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science (80-)* **320**: 792–794.
- Ovchinnikov, S., Kinch, L., Park, H., Liao, Y., Pei, J., Kim, D.E., Kamisetty, H., Grishin, N.V., and Baker, D. (2015) Large-scale determination of previously unsolved protein structures using evolutionary information. *Elife* **4**: e09248.
- Pacheco-Gómez, R., Cheng, X., Hicks, M.R., Smith, C.J.I., Roper, D.I., Addinall, S., Rodger, A., and Dafforn, T.R. (2013) Tetramerization of ZapA is required for FtsZ bundling. *Biochem J* **449**: 795–802.
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T.J., Walker, S., Kahne, D.E., and Bernhardt, T.G. (2010) Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell* **143**: 1110–1120.
- Park, J.T., and Uehara, T. (2008) How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 211–227.
- Pastoret, S., Fraipont, C., Blaauwen, T. Den, Wolf, B., Aarsman, M.E.G., Piette, A., Thomas, A., Brasseur, R., and Nguyen-Distèche, M. (2004) Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 8370–8379.
- Pazos, M., Peters, K., and Vollmer, W. (2017) Robust peptidoglycan growth by dynamic and variable multi-protein complexes. *Curr Opin Microbiol* **36**: 55–61.
- Pedro, M.A. De, Quintela, J.C., Höltje, J.V., and Schwarz, H. (1997) Murein segregation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 2823–2834.
- Peters, N.T., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2011) A Fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *J Bacteriol* **193**: 4973–4983.
- Peters, N.T., Morlot, C., Yang, D.C., Uehara, T., Vernet, T., and Bernhardt, T.G. (2013) Structure-function analysis of the LytM domain of EnvC, an activator of cell wall remodelling at the *Escherichia coli* division site. *Mol Microbiol* **89**: 690–701.
- Petrou, V.I., Herrera, C.M., Schultz, K.M., Clarke, O.B., Vendome, J., Tomasek, D., Banerjee, S., Rajashankar, K.R., Dufrisne, M.B., Kloss, B., Kloppmann, E., Rost, B., Klug, C.S., Trent, M.S., Shapiro, L., and Mancina, F. (2016) Structural biology: Structures of aminoarabinose transferase ArnT suggest a molecular basis for lipid A glycosylation. *Science (80-)* **351**: 608–612.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J* **21**: 685–93.
- Pichoff, S., Du, S., and Lutkenhaus, J. (2015) The bypass of ZipA by overexpression of FtsN requires a previously unknown conserved FtsN motif essential for FtsA-FtsN interaction supporting a model in

which FtsA monomers recruit late cell division proteins to the Z ring. *Mol Microbiol* **95**: 971–987.

Pichoff, S., Shen, B., Sullivan, B., and Lutkenhaus, J. (2012) FtsA mutants impaired for self-interaction bypass ZipA suggesting a model in which FtsA's self-interaction competes with its ability to recruit downstream division proteins. *Mol Microbiol* **83**: 151–167.

Piette, A., Fraipont, C., Blaauwen, T. Den, Aarsman, M.E.G., Pastoret, S., and Nguyen-Distèche, M. (2004) Structural determinants required to target penicillin-binding protein 3 to the septum of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 6110–6117.

Pinho, M.G., and Errington, J. (2003) Dispersed mode of *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis in the absence of the division machinery. *Mol Microbiol* **50**: 871–881.

Pla, J., Sánchez, M., Palacios, P., Vicente, M., and Aldea, M. (1991) Preferential cytoplasmic location of FtsZ, a protein essential for *Escherichia coli* septation. *Mol Microbiol* **5**: 1681–6.

Ploeg, R. Van der, Verheul, J., Vischer, N.O.E., Alexeeva, S., Hoogendoorn, E., Postma, M., Banzhaf, M., Vollmer, W., and den Blaauwen, T. (2013) Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **87**: 1074–1087.

Poggio, S., Takacs, C.N., Vollmer, W., and Jacobs-Wagner, C. (2010) A protein critical for cell constriction in the Gram-negative bacterium *Caulobacter crescentus* localizes at the division site through its peptidoglycan-binding LysM domains. *Mol Microbiol* **77**: 74–89.

Pompliano, D.L., Gomez, R.P., and Anthony, N.J. (1992) Intramolecular fluorescence enhancement: a continuous assay of Ras farnesyl:protein transferase. *J Am Chem Soc* **114**: 7945–7946.

Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A. (2007) *Microbiologie* (7^eed.) Bruxelles, Belgique : Edition De Boeck Université.

Priyadarshini, R., Pedro, M.A. De, and Young, K.D. (2007) Role of peptidoglycan amidases in the development and morphology of the division septum in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 5334–5347.

Priyadarshini, R., Popham, D.L., and Young, K.D. (2006) Daughter cell separation by penicillin-binding proteins and peptidoglycan amidases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5345–5355.

Raskin, D.M., and Boer, P.A.J. De (1999) MinDE-dependent pole-to-pole oscillation of division. *J Bacteriol* **181**: 6419–6424.

Rath, A., Tulumello, D. V., and Deber, C.M. (2009) Peptide models of membrane protein folding. *Biochemistry* **48**: 3036–3045.

Reith, J., and Mayer, C. (2011) Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **92**: 1–11.

Rice, L.B., Carias, L.L., Rudin, S., Hutton, R., Marshall, S., Hassan, M., Josseume, N., Dubost, L., Marie, A. and Arthur, M. (2009) Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* **191**: 3649–56.

Rico, A.I., García-Ovalle, M., Palacios, P., Casanova, M., and Vicente, M. (2010) Role of *Escherichia coli* FtsN protein in the assembly and stability of the cell division ring. *Mol Microbiol* **76**: 760–771.

Rocaboy, M., Herman, R., Sauvage, E., Remaut, H., Moonens, K., Terrak, M., Charlier, P., and Kerff, F. (2013) The crystal structure of the cell division amidase Amic reveals the fold of the AMIN domain, a new peptidoglycan binding domain. *Mol Microbiol* **90**: 267–277.

- Rodrigues, C.D.A., and Harry, E.J. (2012) The Min system and nucleoid occlusion are not required for identifying the division site in *Bacillus subtilis* but ensure its efficient utilization. *PLoS Genet* **8**: e1002561.
- Rohs, P.A.D., Buss, J., Sim, S., Squyres, G., Srisuknimit, V., Smith, M., Cho, H., Sjodt, M., Kruse, A.C., Garner, E., Walker, S., Kahne, D., and Bernhardt, T.G. (2018) An activation pathway governs cell wall polymerization by a bacterial morphogenic machine. *bioRxiv* <http://biorxiv.org/content/early/2018/06/29/359208.abstract>.
- Romberg, L., and Levin, P.A. (2003) Assembly Dynamics of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ: Poised at the Edge of Stability. *Annu Rev Microbiol* **57**: 125–154.
- Romeis, T., Vollmer, W., and Holtje, J. V (1993) CHARACTERIZATION OF 3 DIFFERENT LYTIC TRANSGLYCOSYLASES IN *ESCHERICHIA COLI*. *Fems Microbiol Lett* **111**: 141–146.
- Rowlett, V.W., and Margolin, W. (2014) Asymmetric constriction of dividing *Escherichia coli* cells induced by expression of a fusion between two min proteins. *J Bacteriol* **196**: 2089–2100.
- Rubino, F.A., Kumar, S., Ruiz, N., Walker, S., and Kahne, D.E. (2018) Membrane Potential Is Required for MurJ Function. *J Am Chem Soc* **140**: 4481–4484.
- Ruby, J.D., Li, H., Kuramitsu, H., Norris, S.J., Goldstein, S.F., Buttle, K.F., and Charon, N.W. (1997) Relationship of *Treponema denticola* periplasmic flagella to irregular cell morphology. *J Bacteriol* **179**: 1628–1635.
- Ruiz, N. (2008) Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 15553–15557.
- Ruiz, N. (2015) Lipid flippases for bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Lipid Insights* **2015**: 21–31.
- Sauvage, E., Derouaux, A., Fraipont, C., Joris, M., Herman, R., Rocaboy, M., Schloesser, M., Dumas, J., Kerff, F., Nguyen-Distèche, M., and Charlier, P. (2014) Crystal structure of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*. *PLoS One* **9**: e98042.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 234–258.
- Schiffer, G., and Höltje, J.V. (1999) Cloning and characterization of PBP 1C, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 32031–32039.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**: 407–477.
- Schmidt, K.L., Peterson, N.D., Kustus, R.J., Wissel, M.C., Graham, B., Phillips, G.J., and Weiss, D.S. (2004) A Predicted ABC Transporter, FtsEX, Is Needed for Cell Division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 785–793.
- Schumacher, M.A., Zeng, W., Huang, K.H., Tchorzewski, L., and Janakiraman, A. (2016) Structural and functional analyses reveal insights into the molecular properties of the *Escherichia coli* Z ring stabilizing protein, ZapC. *J Biol Chem* **291**: 2485–2498.
- Schwartz, B., Markwalder, J.A., Seitz, S.P., Wang, Y., and Stein, R.L. (2002) A kinetic characterization of the glycosyltransferase activity of *Escherichia coli* PBP1b and development of a continuous fluorescence assay. *Biochemistry* **41**: 12552–12561.
- Sham, L.-T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Ruiz, N. (2014) MurJ is the flippase

of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science (80-)* **345**: 220–222.

Shiomi, D., Sakai, M., and Niki, H. (2008) Determination of bacterial rod shape by a novel cytoskeletal membrane protein. *EMBO J* **27**: 3081–3091.

Shockman, G.D., and Höltje, J. V. (1994) Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. *New Compr Biochem* **27**: 131–166.

Siefert, J.L., and Fox, G.E. (1998) Phylogenetic mapping of bacterial morphology. *Microbiology* **144**: 2803–2808.

Singh, S.K., Saisree, L., Amrutha, R.N., and Reddy, M. (2012) Three redundant murein endopeptidases catalyse an essential cleavage step in peptidoglycan synthesis of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol* **86**: 1036–1051.

Sjodt, M., Brock, K., Dobihal, G., Rohs, P.D.A., Green, A.G., Hopf, T.A., Meeske, A.J., Srisuknimit, V., Kahne, D., Walker, S., Marks, D.S., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z., and Kruse, A.C. (2018) Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis. *Nature* **556**: 118–121.

Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: Multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**: 249–262.

Söderström, B., Skoog, K., Blom, H., Weiss, D.S., Heijne, G. von, and Daley, D.O. (2014) Disassembly of the divisome in *Escherichia coli*: Evidence that FtsZ dissociates before compartmentalization. *Mol Microbiol* **92**: 1–9.

Souza, R.F. de, Anantharaman, V., Souza, S.J. de, Aravind, L., and Gueiros-Filho, F.J. (2008) AMIN domains have a predicted role in localization of diverse periplasmic protein complexes. *Bioinformatics* **24**: 2423–2426.

Spratt, B.G. (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci* **72**: 2999–3003.

Spratt, B.G., and Strominger, J.L. (1976) Identification of the major penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* as D-alanine carboxypeptidase IA. *J Bacteriol* **127**: 660–663.

Spratt, B.G., Jobanputra, V., and Zimmermann, W. (1977) Binding of thienamycin and clavulanic acid to the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* **12**: 406–409.

Stouf, M., Meile, J.-C., and Cornet, F. (2013) FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 11157–11162.

Sturgis, J.N. (2001) Organisation and Evolution of the tol-pal Gene Cluster. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 113–122.

Sung, M.-T., Lai, Y.-T., Huang, C.-Y., Chou, L.-Y., Shih, H.-W., Cheng, W.-C., Wong, C.-H., and Ma, C. (2009) Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 8824–8829

Suzuki, H., Nishimura, Y., and Hirota, Y. (1978) On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 664–668.

Sycuro, L.K., Pincus, Z., Gutierrez, K.D., Biboy, J., Stern, C.A., Vollmer, W., and Salama, N.R. (2010) Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. *Cell* **141**: 822–833.

- Szwedziak, P., Wang, Q., Freund, S.M., and Löwe, J. (2012) FtsA forms actin-like protofilaments. *EMBO J* **31**: 2249–2260.
- Taguchi, A., Welsh, M.A., Marmont, L.S., Lee, W., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Walker, S. (2018) FtsW is a peptidoglycan polymerase that is activated by its cognate penicillin-binding protein. *bioRxiv* <http://biorxiv.org/content/early/2018/06/29/358663.abstract>.
- Teleha, M.A., Miller, A.C., and Larsen, R.A. (2013) Overexpression of the *Escherichia coli* TolQ protein leads to a null-FtsN-like division phenotype. *Microbiologyopen* **2**: 618–632.
- Templin, M.F., Ursinus, A., and Höltje, J.V. (1999) A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J* **18**: 4108–4117.
- Terrak, M., Ghosh, T.K., Heijenoort, J. Van, Beeumen, J. Van, Lampilas, M., Aszodi, J., Ayala, J.A., Ghuysen, J.M., and Nguyen-Distèche, M. (1999) The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 350–364.
- Thunnissen, A.M.W.H., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Rozeboom, H.J., Engel, H., Keck, W., and Dijkstra, B.W. (1994) Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography. *Nature* **367**: 750–753.
- Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 1133–1141.
- Tonthat, N.K., Arold, S.T., Pickering, B.F., Dyke, M.W. Van, Liang, S., Lu, Y., Beuria, T.K., Margolin, W., and Schumacher, M.A. (2011) Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J* **30**: 154–164.
- Tonthat, N.K., Milam, S.L., Chinnam, N., Whitfill, T., Margolin, W., and Schumacher, M.A. (2013) SlmA forms a higher-order structure on DNA that inhibits cytokinetic Z-ring formation over the nucleoid. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 10586–10591.
- Trip, E.N., and Scheffers, D.-J. (2015) A 1 MDa protein complex containing critical components of the *Escherichia coli* divisome. *Sci Rep* **5**: 18190.
- Tsang, M.J., and Bernhardt, T.G. (2015) A role for the FtsQLB complex in cytokinetic ring activation revealed by an ftsL allele that accelerates division. *Mol Microbiol* **95**: 925–944.
- Tsang, M.-J., Yakhnina, A.A., and Bernhardt, T.G. (2017) NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **13**: e1006888.
- Typas, A., Banzhaf, M., Berg Van Saparoea, B. Van Den, Verheul, J., Biboy, J., Nichols, R.J., Zietek, M., Beilharz, K., Kannenberg, K., Von Rechenberg, M., Breukink, E., den Blaauwen, T., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2010) Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell* **143**: 1097–1109.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**: 123–136.
- Uehara, T., and Park, J.T. (2003) Identification of MpaA, an amidase in *Escherichia coli* that hydrolyzes the gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate bond in murein peptides. *J Bacteriol* **185**: 679–682.
- Uehara, T., and Park, J.T. (2007) An anhydro-N-acetylmuramyl-L-alanine amidase with broad specificity tethered to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 5634–5641.

- Uehara, T., and Park, J.T. (2008) Growth of *Escherichia coli*: Significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. *J Bacteriol* **190**: 3914–3922.
- Uehara, T., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2009) LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**: 5094–5107.
- Uehara, T., Parzych, K.R., Dinh, T., and Bernhardt, T.G. (2010) Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J* **29**: 1412–22.
- Ursinus, A., and Holtje, J. V. (1994) Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**: 338–343.
- Valbuena, N., Letek, M., Ordóñez, E., Ayala, J., Daniel, R.A., Gil, J.A., and Mateos, L.M. (2007) Characterization of HMW-PBPs from the rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*: Peptidoglycan synthesis in cells lacking actin-like cytoskeletal structures. *Mol Microbiol* **66**: 643–657.
- van Asselt, E.J., Dijkstra, A.J., Kalk, K.H., Takacs, B., Keck, W., and Dijkstra, B.W. (1999) Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure* **7**: 1167–1180.
- van Asselt, E.J., Kalk, K.H., and Dijkstra, B.W. (2000) Crystallographic studies of the interactions of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 with peptidoglycan. *Biochemistry* **39**: 1924–1934.
- van Asselt, E.J., Thunnissen, A.M.W.H., and Dijkstra, B.W. (1999) High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J Mol Biol* **291**: 877–898.
- van Dam, V., Sijbrandi, R., Kol, M., Swiezewska, E., Kruijff, B. De, and Breukink, E. (2007) Transmembrane transport of peptidoglycan precursors across model and bacterial membranes. *Mol Microbiol* **64**: 1105–1114.
- van den Ent, F., and Löwe, J. (2000) Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *EMBO J* **19**: 5300–7.
- van den Ent, F., Vinkenvleugel, T.M.F., Ind, A., West, P., Veprintsev, D., Nanninga, N., *et al.* (2008) Structural and mutational analysis of the cell division protein FtsQ. *Mol Microbiol* **68**: 110–123.
- van Heijenoort, J. (2007) Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 620–35.
- van Heijenoort, Y., Gomez, M., Derrien, M., Ayala, J., and Heijenoort, J. Van (1992) Membrane intermediates in the peptidoglycan metabolism of *Escherichia coli*: Possible roles of PBP 1b and PBP 3. *J Bacteriol* **174**: 3549–3557.
- van Teeffelen, S., Wang, S., Furchtgott, L., Huang, K.C., Wingreen, N.S., Shaevitz, J.W., and Gitai, Z. (2011) The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 15822–15827.
- Vanaken, T., Foxall-Vanaken, S., Castleman, S., and Ferguson-Miller, S. (1986) Alkyl Glycoside Detergents: Synthesis and Applications to the Study of Membrane Proteins. *Methods Enzymol* **125**: 27–35.
- Villanelo, F., Ordenes, A., Brunet, J., Lagos, R., and Monasterio, O. (2011) A model for the *Escherichia coli* FtsB/FtsL/FtsQ cell division complex. *BMC Struct Biol* **11**: 28.
- Vollmer, W. (2008) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol*

Rev **32**: 287–306.

Vollmer, W. (2015) Peptidoglycan. In *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, pp. 105–124.

Vollmer, W., and Seligman, S.J. (2010) Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol* **18**: 59–66.

Vollmer, W., Blanot, D., and Pedro, M.A. De (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 149–167.

Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 259–286.

Vollmer, W., Rechenberg, M. Von, and Höltje, 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.

Vötsch, W., and Templin, M.F. (2000) Characterization of a beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in mucopeptide recycling and beta-lactamase induction. *J Biol Chem* **275**: 39032–39038.

Wachi, M., Doi, M., Okada, Y., and Matsushashi, M. (1989) New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* **171**: 6511–6.

Wagner, S., Klepsch, M.M., Schlegel, S., Appel, A., Draheim, R., Tarry, M., Hogbom, M., Van Wijk, K.J., Slotboom, D.J., Persson, J.O., and De Gier, J.W. (2008) Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 14371–14376.

Wang, L., and Lutkenhaus, J. (1998) FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. *Mol Microbiol* **29**: 731–740.

Wang, Q.M., Peery, R.B., Johnson, R.B., Alborn, W.E., Yeh, W.K., and Skatrud, P.L. (2001) Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**: 4779–4785.

Waxman, D.J., and Strominger, J.L. (1983) Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics. *Annu Rev Biochem* **52**: 825–869.

WEIDEL, W., and PELZER, H. (1964) BAGSHAPED MACROMOLECULES--A NEW OUTLOOK ON BACTERIAL CELL WALLS. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **26**: 193–232.

Weiss, D.S. (2015) Last but not least: New insights into how FtsN triggers constriction during *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol* **95**: 903–909.

Welzel, P. (2005) Syntheses around the transglycosylation step in peptidoglycan biosynthesis. *Chem Rev* **105**: 4610–60.

White, R.J., and Pasternak, C.A. (1967) The purification and properties of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*. *Biochem J* **105**: 121–125.

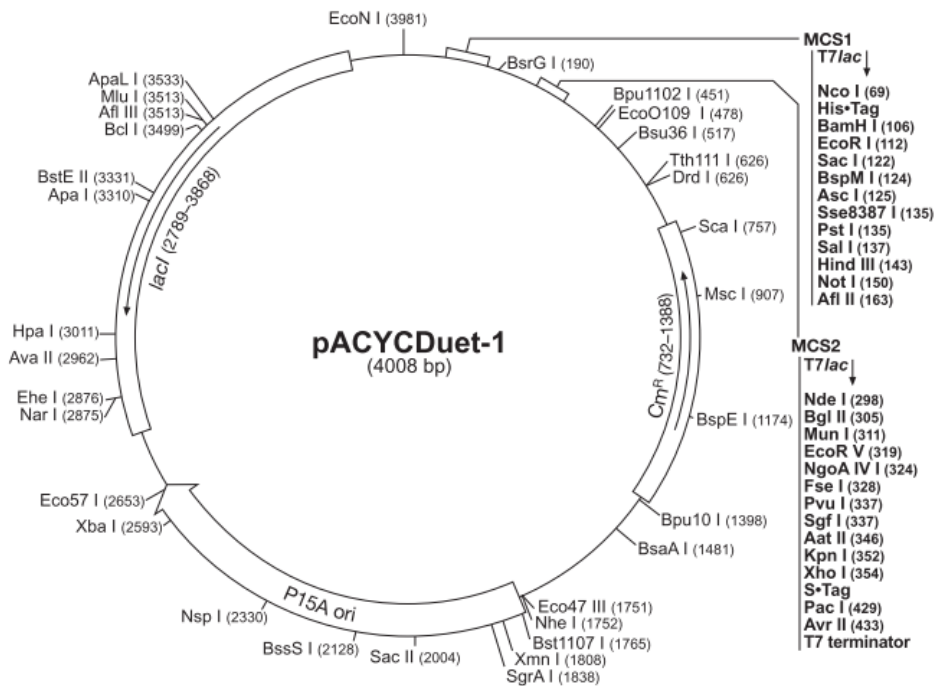
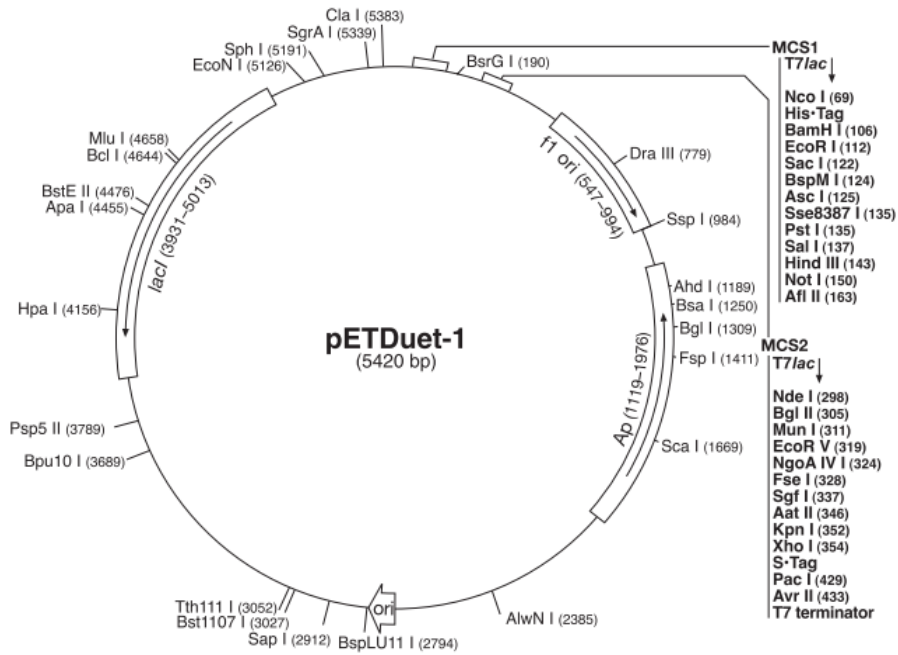
Williams, K.B., (2010) *The DamX cell division protein of Escherichia coli: Identification of amino acid residues critical for septal localization and peptidoglycan binding*. Ph.D. Thesis. University of Iowa

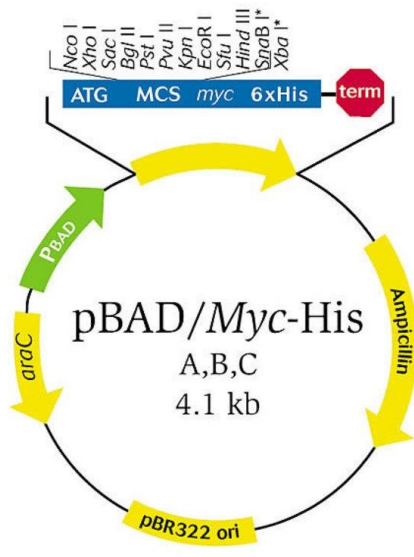
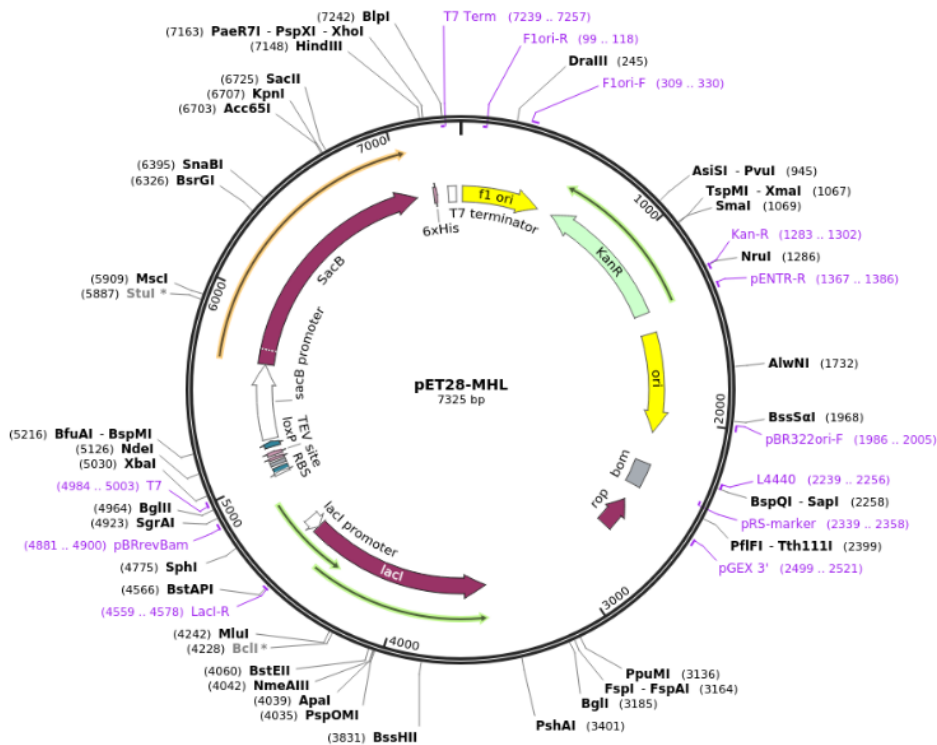
Wissel, M.C., and Weiss, D.S. (2004) Genetic Analysis of the Cell Division Protein FtsI (PBP3): Amino Acid Substitutions that Impair Septal Localization of FtsI and Recruitment of FtsN. *J Bacteriol* **186**: 490–502.

- Wissel, M.C., Wendt, J.L., Mitchell, C.J., and Weiss, D.S. (2005) The transmembrane helix of the *Escherichia coli* division protein FtsI localizes to the septal ring. *J Bacteriol* **187**: 320–328.
- Wolgemuth, C.W., Charon, N.W., Goldstein, S.F., and Goldstein, R.E. (2006) The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* **11**: 221–227.
- Yahashiri, A., Jorgenson, M.A., and Weiss, D.S. (2015) Bacterial SPOR domains are recruited to septal peptidoglycan by binding to glycan strands that lack stem peptides. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 11347–11352.
- Yang, D.C., Peters, N.T., Parzych, K.R., Uehara, T., Markovski, M., and Bernhardt, T.G. (2011) An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E1052-60.
- Yang, D.C., Tan, K., Joachimiak, A., and Bernhardt, T.G. (2012) A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division. *Mol Microbiol* **85**: 768–781.
- Yang, J.C., Ent, F. Van Den, Neuhaus, D., Brevier, J., and Löwe, J. (2004) Solution structure and domain architecture of the divisome protein FtsN. *Mol Microbiol* **52**: 651–660.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K.C., and Xiao, J. (2017) GTPase activity-coupled treadmill of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell wall synthesis. *Science (80-)* **355**: 744–747.
- Young, K.D. (2006) The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 660–703.
- Young, K.D. (2007) Bacterial morphology: why have different shapes? *Curr Opin Microbiol* **10**: 596–600.
- Yu, X.C., Tran, A.H., Sun, Q., and Margolin, W. (1998) Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-Terminal targeting domain. *J Bacteriol* **180**: 1296–1304.
- Yunck, R., Cho, H., and Bernhardt, T.G. (2016) Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol Microbiol* **99**: 700–718.
- Zapun, A., Vernet, T., and Pinho, M.G. (2008) The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 345–360.
- Zhao, H., Patel, V., Helmann, J.D., and Dörr, T. (2017) Don't let sleeping dogmas lie: new views of peptidoglycan synthesis and its regulation. *Mol Microbiol* **106**: 847–860.
- Zijderveld, C.A.L., Aarsman, M.E.G., Blaauwen, T. Den, and Nanninga, N. (1991) Penicillin-binding protein 1B of *Escherichia coli* exists in dimeric forms. *J Bacteriol* **173**: 5740–5746

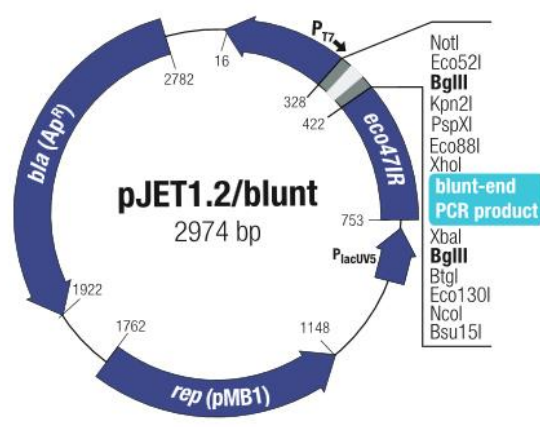
VII. Annexes

Annexe A : Cartes des plasmides utilisés au cours de ce travail.





* Frame-dependent variations



Annexe B : Oligonucléotides

Mutagenèse dirigée du domaine AMIN

Noms	Séquences (5'-3')
R49A sens R49A antisens	GCGTCCAGCTACACCGCCGTGACGGTGGAAATC GATTCACCGTCACGGCGGTGTAGCTGGACGC
E53A sens E53A antisens	CCCGCGTGACGGTGCGTCAAATCGTCAGC GGGCGCACTGCCACCGCAGTTTAGCAGTCG
K59A sens K59A antisens	GAATCAAATCGTCAGCTGGCATATAAGCAGTTCGCG CGCGAACTGCTTATATGCCAGCTGACGATTTGATTC
F63A sens F63A antisens	GCTGAAATATAAGCAGGCCGCGTTGAGTAACCCTG CAGGGTACTCAACGCGGCCCTGCTTATATTTTCAGC
L65A sens L65A Antisens	GAAATATAAGCAGTTCGCGGCGAGTAACCCTGAACGC GCGTTCAGGGTACTCGCCGCCAACTGCTTATATTTTC
R70A sens R70A antisens	GTTGAGTAACCCTGAAGCCGTGGTGGTGGATATCG CGATATCCACCACCACGGCTTCAGGGTACTCAAC
D74A sens D74A antisens	CGCGTGGTGGTGCTATCGAAGATGTAAAC GTTTACATCTTCGATAGCCACCACCACGCG
I75A sens I75A antisens	CGCGTGGTGGTGGATGCCGAAGATGTAAACCTG CAGGTTTACATCTTCGGCATCCACCACCACGCG
R102A sens R102A antisens	GTTTCATCAAGTCGCGCGCGCCGCAATTTGACCCG GTCAAATTGCCGACGGCCGCCGACTTGATGAAC
V103A sens V103A antisens	CATCAAGTCGGCGCGCGCCGGGCAATTTGACCCG CGGGTCAAATTGCCCGCGCGCCGACTTGATG
G104A sens G104A antisens	CAAGTCGGCGCGCGTCCGCCAATTTGACCCGCG GCGGGTCAAATTGCCGACGCGCGCCGACTTG
F106A sens F106A antisens	CGCGCGTCGGGCAAAGCTGACCCGCAAACCGTAC GTACGGTTTGCGGGTCAGCTTGCCCGACGCGCG
V111A sens V111A antisens	GACCCGCAAACCGCACGGATGGTTTTTTG CAAAAACCATCCGTGGGTTTGC GGTC
R112A sens R112A antisens	CCCGCAAACCGTAGCGATGGTTTTTTGAATTAAG CTTTAATTCAAAAACCATCGCTACGGTTTGC GG
R112K sens R112K antisens	GACCCGCAAACCGTAAAGATGGTTTTTTGAATTAAG CTTTAATTCAAAAACCATCTTACGGTTTGC GGTC
M113A sens M113A antisens	CGCAAACCGTACGGCGGTTTTTTGAATTAAGC GCTTTAATTCAAAAACCGCCCGTACGGTTTGC
F115A sens F115A antisens	CCGTACGGATGGTTGCTGAATTAAGCAAAAACG CGTTTTGCTTTAATTCAGCAACCATCCGTACGG
E116A sens E116A antisens	GTACGGATGGTTTTTGCAATTAAGCAAAAACG CGTTTTGCTTTAATGCAAAAACCATCCGTAC
E116Q sens E116Q antisens	CGTACGGATGGTTTTTCAATTAAGCAAAAACG CGTTTTGCTTTAATTGAAAACCATCCGTACG
L117A sens L117A antisens	CGGATGGTTTTTTGAAGCAAAGCAAAAACGTA AAC GTTTTACGTTTTGCTTTGCTTCAAAAACCATCCG
K122A sens K122A antisens	GAATTAAGCAAAAACGTAGCACCGCAGCTGTTTGCC GGCAAACAGCTGCGGTGCTACGTTTTGCTTTAATTC

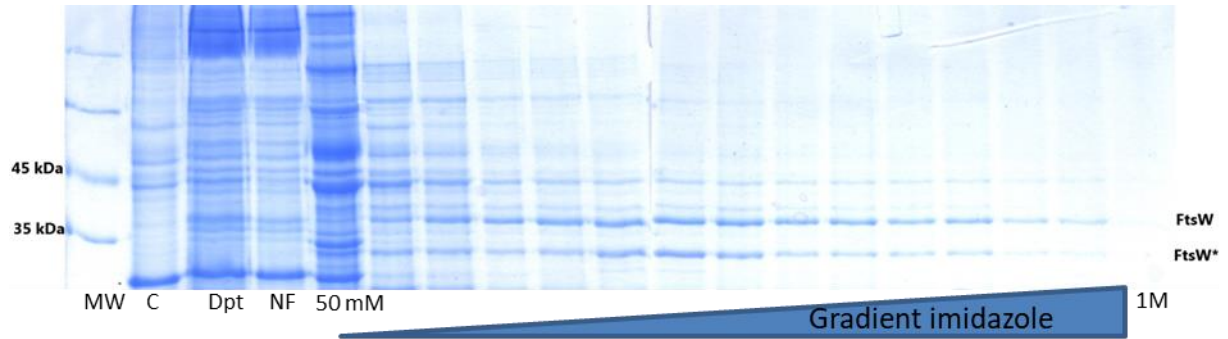
F126A sens	GTAAAACCGCAGCTG GCG GCCCTTGCGCCGGTC
F126A antisens	CATTTTGGCGTCGAC CGC CGGGAACGCGGCCAG
L128A sens	CCGCAGCTGTTTGCC GCC GCGCCGGTCGCCGGG
L128A antisens	GGCGTCGACAAACGG GCG GCGCGCCAGCGGCC
R137A sens	CGCCGGGTTTAAAGAG GCG CTGGTGATGGACCTC
R137A antisens	GCGGCCCAAATTTCTC GCG GACCACTACCTGGAG
D141A sens	GAGCGTCTGGTGATG GCC CTCTATCCGGCCAATG
D141A antisens	CATTGGCCGGATAGAG GCC ATCACCAGACGCTC
V103A/G104A sens	CACAAGTCGGCGCG CCG CGCAATTTGA
V103A/G104A antisens	GCGGGTCAAATTGC GCG GCGCGCGCCGAC
R102A/V103A/G104A sens	GTTTCATCAAGTCGGCG GCC GCGCGCAATTTGAC
R102A/V103A/G104A antisens	GTCAAATTGC GCG GCG GCC GCCGACTTGATGAAC
R70A/D74A sens	CCCTGAAG CCG TGGTGGT GCT ATCGAAGATGTAAAC
R70A/D74A antisens	GTTTACATCTT CGA TAGCCACCACC GGC TTCAGGG
R112A/E116A sens	CCGCAAACCGTAG GCG ATGGTTTTT GCA TAAAGCAAAAAC
R112A/E116A antisens	GTTTTGCTTTA TGC AAAAACCAT CGC TACGGTTTTGCG

Construction fusion sfGFP

Noms	Séquences 5'-3'
pBAD 2840 sens	GCGGTATTTACACCGTATATGGTGCACTCTC
pBAD 2840 antisens	GAGAGTGCACCATATACGGTGTGAAATACCGC
Linker sens	CATGGGCCACATATGCACTCTCGAGGGTGGCGGCTCTGGTGGCGG CTCTGCGAGATCTACTAA
Linker antisens	AGCTTTAGTAGATCTCGCAGAGCCGCCACCAGAGCCGCCACCCTCG AGAGTGCATATGTGGCC
Peptide signal sens	CATGGATGTCAGGATCCAACACTGCAATCAGCCGTCGTCGTTTACT GCAAGGCGCGGGTGCCATGTGGCTATTGAGCGTAAGTCAGGTCAG TCTGGCTGCGGTCAGCCA
Peptide signal antisens	TATGGCTGACCGCAGCCAGACTGACCTGACTTACGCTCAATAGCCA CATGGCACCCGCGCCTTGACAGTAAACGACGACGGCTGATTGCAGTG TTGGATCCTGACATC
SfGFP_For BglII	ACGAGATCTATGGTGTCTAAAGGTGAAGAACTG
sfGFP_Rev HindIII	GCCAAGCTTTTAGGATCCTTTGTAGAGCTCATC

Annexe C : Purification de FtsW d'*E.coli*

MW : marqueur de poids moléculaire. **Dpt** : échantillon de départ. **NF** : fraction non fixée. **C** : culot. **FtsW*** : correspond à une dégradation de FtsW



Annexe D : Analyses statistiques des résultats obtenus en fluorescence continue

Classification	p-Value
NS	>0,1
0	0,05<p<0,1
*	0,01<p<0,05
**	0,001<p<0,01
***	<0,0001

NS : non significative

Analyse statistique des résultats présentés dans la figure IV.9 p.96

	Level	- Level	Difference	p-Value		p-Value
30 S	Lipide II	PBP1b	9,167817	0,0104*		*
	FtsW	PBP1b	8,633073	0,0153*		*
	PBP3	PBP1b	6,504633	0,0717		0
	FtsW-PBP3	PBP1b	6,007990	0,1025		NS
	Lipide II	FtsW-PBP3	3,159827	0,5927		NS
	Lipide II	PBP3	2,663183	0,7236		NS
	FtsW	FtsW-PBP3	2,625083	0,7334		NS
	FtsW	PBP3	2,128440	0,8493		NS
	Lipide II	FtsW	0,534743	0,9990		NS
	PBP3	FtsW-PBP3	0,496643	0,9992		NS
120 S	Lipide II	PBP1b	28,80016	<,0001*		***
	FtsW	PBP1b	26,90584	<,0001*		***
	PBP3	PBP1b	17,32704	0,0010*		**
	FtsW-PBP3	PBP1b	15,06074	0,0029*		**
	Lipide II	FtsW-PBP3	13,73942	0,0055*		**
	FtsW	FtsW-PBP3	11,84510	0,0146*		*
	Lipide II	PBP3	11,47312	0,0178*		*
	FtsW	PBP3	9,57880	0,0489*		*
	PBP3	FtsW-PBP3	2,26630	0,9302		NS
	Lipide II	FtsW	1,89432	0,9620		NS

	Level	- Level	Difference	p-Value		p-Value
300 S	Lipide II	PBP1b	47,34148	<,0001*		***
	FtsW	PBP1b	44,85496	<,0001*		***
	Lipide II	FtsW-PBP3	34,84422	<,0001*		***
	FtsW	FtsW-PBP3	32,35770	<,0001*		***
	Lipide II	PBP3	27,53296	<,0001*		***
	FtsW	PBP3	25,04645	<,0001*		***
	PBP3	PBP1b	19,80852	0,0002*		***
	FtsW-PBP3	PBP1b	12,49726	0,0059*		**
	PBP3	FtsW-PBP3	7,31126	0,1155		NS
	Lipide II	FtsW	2,48652	0,8774		NS
600 S	Lipide II	PBP1b	54,58604	<,0001*		***
	FtsW	PBP1b	52,50775	<,0001*		***
	Lipide II	FtsW-PBP3	49,11400	<,0001*		***
	FtsW	FtsW-PBP3	47,03571	<,0001*		***
	Lipide II	PBP3	40,71502	<,0001*		***
	FtsW	PBP3	38,63673	<,0001*		***
	PBP3	PBP1b	13,87103	0,0005*		**
	PBP3	FtsW-PBP3	8,39899	0,0189*		*
	FtsW-PBP3	PBP1b	5,47204	0,1540		NS
	Lipide II	FtsW	2,07829	0,8628		NS
1200 S	Lipide II	PBP1b	60,92111	<,0001*		***
	Lipide II	FtsW-PBP3	58,63558	<,0001*		***
	FtsW	PBP1b	57,89848	<,0001*		***
	FtsW	FtsW-PBP3	55,61295	<,0001*		***
	Lipide II	PBP3	51,30428	<,0001*		***
	FtsW	PBP3	48,28165	<,0001*		***
	PBP3	PBP1b	9,61682	0,0005*		***
	PBP3	FtsW-PBP3	7,33130	0,0037*		**
	Lipide II	FtsW	3,02263	0,3040		NS
	FtsW-PBP3	PBP1b	2,28553	0,5492		NS

Analyse statistique des résultats présentés dans la figure IV.10 p.97

	Level	- Level	Difference	p-Value		p-Value
30 S	Lipide II	LpoB	5,617877	0,1773		NS
	Lipide II	PBP1b	4,847813	0,2696		NS
	Lipide II	LpoB / FtsW	3,060123	0,6143		NS
	LpoB / FtsW	LpoB	2,557753	0,7287		NS
	LpoB / FtsW	PBP1b	1,787690	0,8818		NS
	PBP1b	LpoB	0,770063	0,9883		NS
120 S	Lipide II	LpoB	30,14907	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	LpoB	25,10955	<,0001*		***
	PBP1b	LpoB	17,27998	0,0002*		***
	Lipide II	PBP1b	12,86910	0,0012*		**
	LpoB / FtsW	PBP1b	7,82957	0,0231*		*
	Lipide II	LpoB / FtsW	5,03952	0,1505		NS
300 S	Lipide II	LpoB	57,97989	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	LpoB	53,44873	<,0001*		***
	Lipide II	PBP1b	30,30622	<,0001*		***
	PBP1b	LpoB	27,67367	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	PBP1b	25,77506	<,0001*		***
	Lipide II	LpoB / FtsW	4,53116	0,3712		NS
600 S	Lipide II	LpoB	69,45998	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	LpoB	62,17459	<,0001*		***
	Lipide II	PBP1b	46,10014	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	PBP1b	38,81475	<,0001*		***
	PBP1b	LpoB	23,35984	<,0001*		***
	Lipide II	LpoB / FtsW	7,28539	0,0098*		**
1200 S	Lipide II	LpoB	74,24457	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	LpoB	64,87836	<,0001*		***
	Lipide II	PBP1b	56,62522	<,0001*		***
	LpoB / FtsW	PBP1b	47,25901	<,0001*		***
	PBP1b	LpoB	17,61935	0,0002*		***
	Lipide II	LpoB / FtsW	9,36622	0,0117*		*

Analyse statistique des résultats présentés dans la figure IV.16 p.103

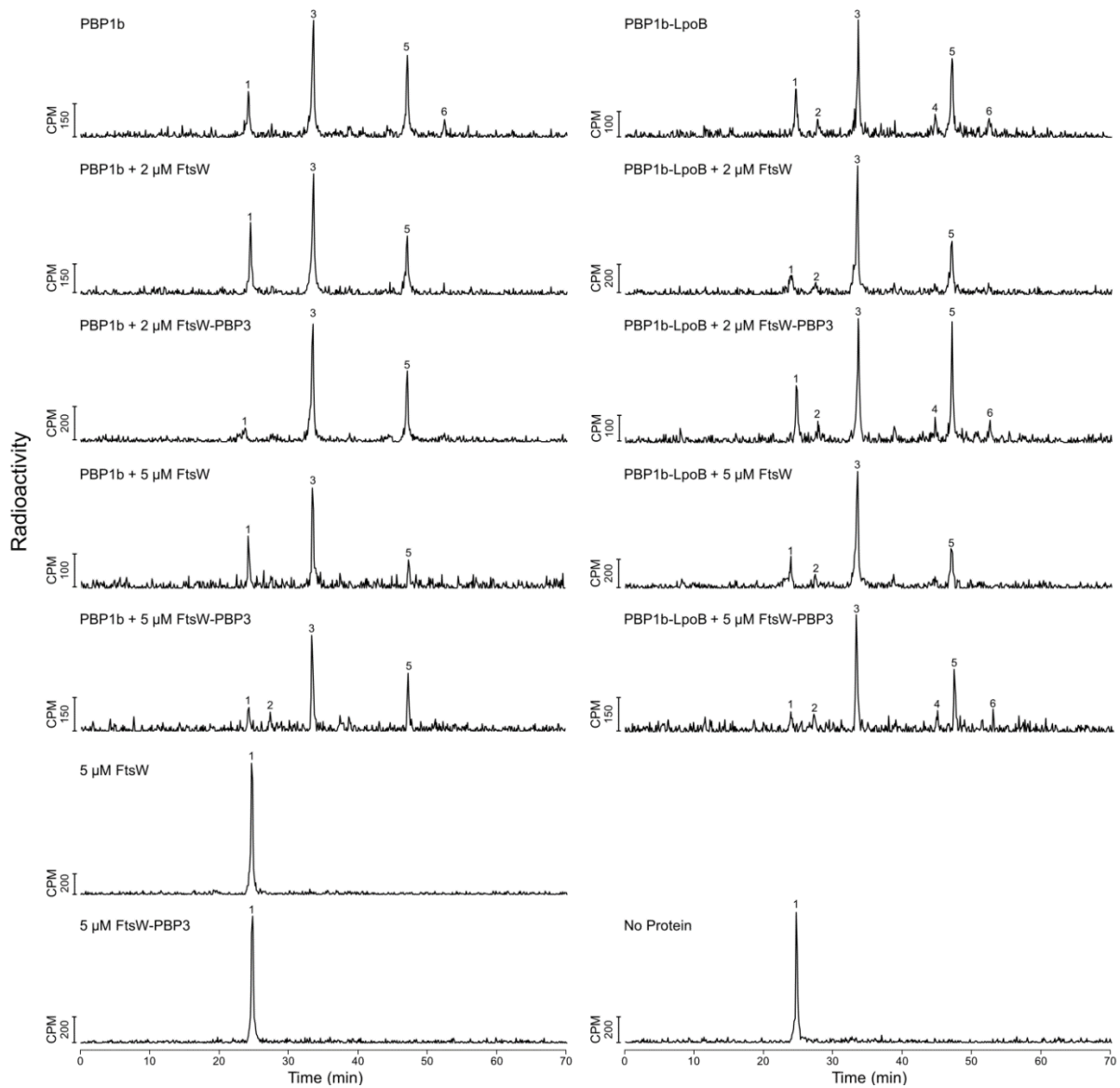
	Level	- Level	Difference	p-Value		p-Value
30 S	Lipide II	MurJ 0,5 μ M	12,86183	0,0779		NS
	Lipide II	MurJ 1,5 μ M	10,19773	0,1642		NS
	Lipide II	PBP1b	9,64558	0,1925		NS
	Lipide II	MurJ 5 μ M	8,44854	0,2714		NS
	MurJ 5 μ M	MurJ 0,5 μ M	4,41330	0,7447		NS
	PBP1b	MurJ 0,5 μ M	3,21625	0,8904		NS
	MurJ 1,5 μ M	MurJ 0,5 μ M	2,66410	0,9389		NS
	MurJ 5 μ M	MurJ 1,5 μ M	1,74920	0,9857		NS
	MurJ 5 μ M	PBP1b	1,19705	0,9966		NS
	PBP1b	MurJ 1,5 μ M	0,55215	0,9998		NS
120 S	Lipide II	PBP1b	34,82110	0,0118*		*
	Lipide II	MurJ 0,5 μ M	32,24005	0,0164*		*
	Lipide II	MurJ 1,5 μ M	32,08049	0,0167*		*
	Lipide II	MurJ 5 μ M	28,29010	0,0281*		*
	MurJ 5 μ M	PBP1b	6,53100	0,8129		NS
	MurJ 5 μ M	MurJ 0,5 μ M	3,94995	0,9593		NS
	MurJ 5 μ M	MurJ 1,5 μ M	3,79039	0,9647		NS
	MurJ 1,5 μ M	PBP1b	2,74061	0,9889		NS
	MurJ 0,5 μ M	PBP1b	2,58105	0,9911		NS
	MurJ 1,5 μ M	MurJ 0,5 μ M	0,15956	1,0000		NS
300 S	Lipide II	PBP1b	52,51839	0,0005*		***
	Lipide II	MurJ 5 μ M	51,25966	0,0005*		***
	Lipide II	MurJ 0,5 μ M	51,11056	0,0005*		***
	Lipide II	MurJ 1,5 μ M	50,79768	0,0005*		***
	MurJ 1,5 μ M	PBP1b	1,72071	0,9941		NS
	MurJ 0,5 μ M	PBP1b	1,40783	0,9973		NS
	MurJ 5 μ M	PBP1b	1,25873	0,9982		NS
	MurJ 1,5 μ M	MurJ 5 μ M	0,46198	1,0000		NS
	MurJ 1,5 μ M	MurJ 0,5 μ M	0,31288	1,0000		NS
	MurJ 0,5 μ M	MurJ 5 μ M	0,14910	1,0000		NS

600 S	Level	- Level	Difference	p-Value		p-Value
	Lipide II	MurJ 0,5 µM	56,17435	<,0001*		***
	Lipide II	MurJ 5 µM	53,58009	<,0001*		***
	Lipide II	PBP1b	53,34114	<,0001*		***
	Lipide II	MurJ 1,5 µM	53,09855	<,0001*		***
	MurJ 1,5 µM	MurJ 0,5 µM	3,07580	0,8582		NS
	PBP1b	MurJ 0,5 µM	2,83321	0,8881		NS
	MurJ 5 µM	MurJ 0,5 µM	2,59426	0,9142		NS
	MurJ 1,5 µM	MurJ 5 µM	0,48154	0,9998		NS
	MurJ 1,5 µM	PBP1b	0,24259	1,0000		NS
	PBP1b	MurJ 5 µM	0,23895	1,0000		NS

1200 S	Level	- Level	Difference	p-Value		p-Value
	Lipide II	MurJ 0,5 µM	58,89428	<,0001*		***
	Lipide II	MurJ 5 µM	57,06822	<,0001*		***
	Lipide II	PBP1b	56,00778	<,0001*		***
	Lipide II	MurJ 1,5 µM	54,95359	<,0001*		***
	MurJ 1,5 µM	MurJ 0.5	3,94069	0,7707		NS
	PBP1b	MurJ 0.5	2,88650	0,9027		NS
	MurJ 1,5 µM	MurJ 5 µM	2,11463	0,9645		NS
	MurJ 5 µM	MurJ 0,5 µM	1,82606	0,9787		NS
	PBP1b	MurJ 5 µM	1,06044	0,9972		NS
	MurJ 1,5 µM	PBP1b	1,05419	0,9972		NS

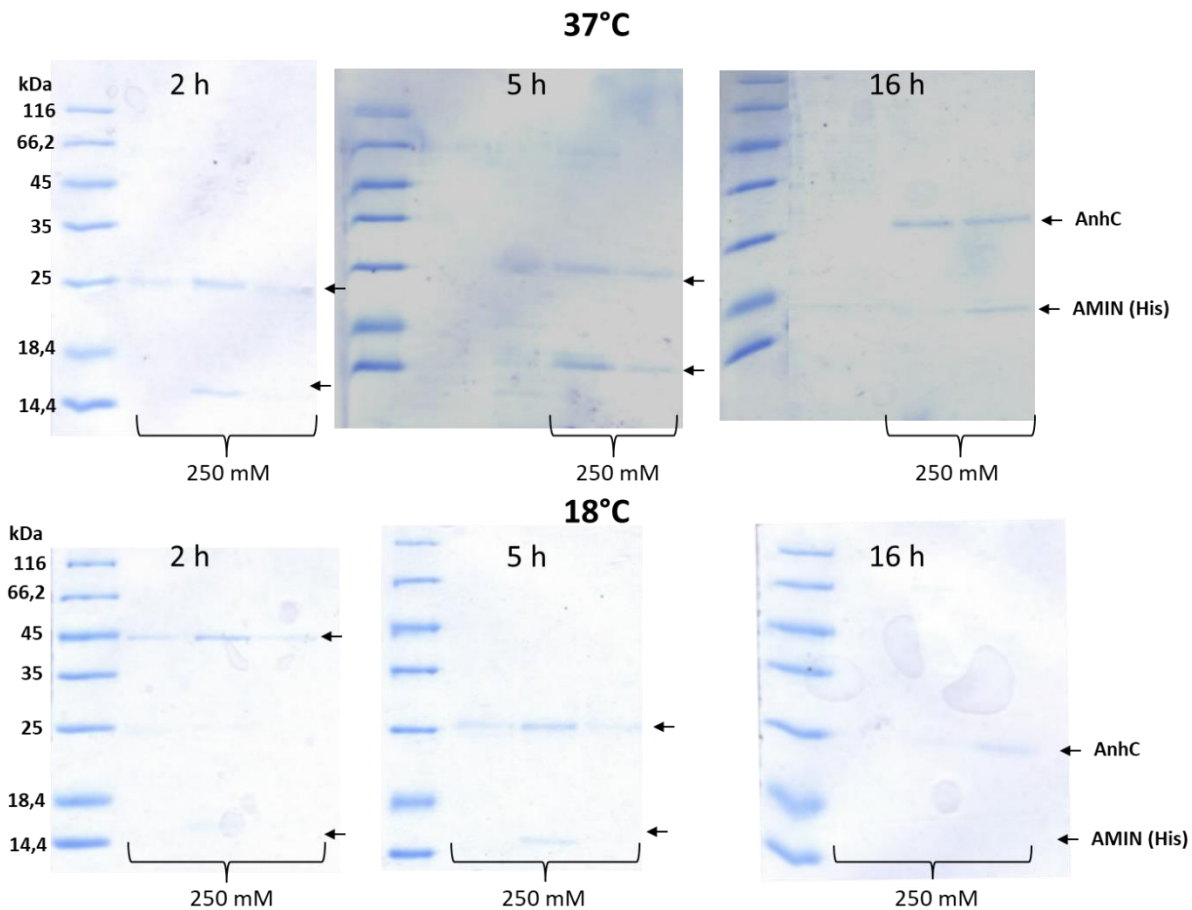
Annexe E : Effet de FtsW et du complexe FtsW-PBP3 sur l'activité du PBP1b.

Les chromatogrammes HPLC montrent le profil mucopeptidique des réactions *in vitro* : PBP1b ou PBP1b-LpoB ont été incubé avec le lipide II en présence ou en l'absence de FtsW ou FtsW-PBP3. Le PG résultant a été digéré par le Cellosyl, les mucopeptides issus de cette digestion ont été réduits avec du borohydrure de sodium et séparé par HPLC. 1 : le disaccharide pentapeptide monophosphorylé. 2 : disaccharide térapeptide. 3 : disaccharide pentapeptide. 4 : bis-disaccharidetétratérapeptide. 5 : bis-disaccharide térapentapeptide. 6 : tris-disaccharide tétratérapeptide.



Annexe F : Production du domaine AMIN marqué isotopiquement.

Analyse SDS-PAGE sur gel 18% de l'élution à 250 mM d'imidazole du domaine AMIN en M9 dans 2 conditions de température (37°C et 18°C) et 3 temps d'incubation (2, 5 ou 16 heures).



Annexe G : Cristallographie

Conditions du Kit Membfac :

	Kit Robot9 Membfac Peglon												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.1M NaCl 0.1M NaAc PH4.6 12% MPD	0.1M ZnAc 0.1M NaAc PH4.6 12% P4000	0.2M As 0.1M NaAc PH4.6 10% P4000	0.1M NaCl 0.1M NaAc PH4.6 12% isopropanol	0.1M NaAc PH4.6 12% P4000	0.1M NaAc PH4.6 1M As	0.1M NaAc PH4.6 1M MgSO ₄ 7H ₂ O 18% P400	0.1M NaAc PH4.6 0.1M MgCl ₂ 6H ₂ O 18% P400	0.1M NaAc PH4.6 0.1M Li ₂ SO ₄ 1M NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1M NaAc PH4.6 0.1M Li ₂ SO ₄ 1M As	0.1M NaAc PH4.6 0.1M NaCl 12% P6000	0.1M NaAc PH4.6 0.1M MgCl ₂ 12% P6000	0.1M NaCl 0.1M NaAc PH5.6 18% P400
B	0.1M Li ₂ SO ₄ 0.1M NaCl 0.1M Na citrate 12% P4000	0.1M Na citrate PH5.6 0.1M Na citrate 10% isopropanol	0.1M NaCl 0.1M Na citrate PH5.6 12% MPD	0.1M NaCl 0.1M Na citrate PH5.6 1M MgSO ₄	0.1M NaCl 0.1M Na citrate PH5.6 12% P4000	0.1M Li ₂ SO ₄ 0.1M NaCl 12% P6000	0.1M MgCl ₂ 6H ₂ O 0.1M Na citrate PH5.6 4% MPD	0.1M Na citrate PH5.6 0.1M NaCl 4% P400	0.1M Li ₂ SO ₄ 0.1M Na citrate PH5.6 4% P400	0.1M ADAPH 6.5 1M As	0.1M Li ₂ SO ₄ 0.1M ADAPH 6.5 12% P4000 2% isop.	0.1M Na citrate 0.1M Hepes 7.5 12% MPD	0.1M NaCl 0.1M NaAc PH5.6 18% P400
C	0.1M MgCl ₂ 0.1M ADA PH6.5 12% P6000	0.1M ADA PH6.5 12% MPD	0.1M Li ₂ SO ₄ 0.1M ADA PH6.5 1M MgSO ₄	0.3M Li ₂ SO ₄ 0.1M ADA PH6.5 4% P400	0.1M As Hepes 7.5 0.5M Na ₂ H ₂ O 5MK2H	0.1M NaCl 0.1M Hepes PH7.5 10% P4000	0.1M MgCl ₂ 0.1M Hepes 7.5 18% P400	0.1M Hepes 7.5 1M Tartrate	0.1M As 0.1M Hepes 7.5 18% P400	0.1M As 0.1M Hepes 7.5 10% P4000	0.1M Na citrate 0.1M Hepes 7.5 12% MPD	0.1M Na citrate 0.1M Hepes 7.5 12% MPD	0.1M Hepes PH7.5 1M Na citrate
D	0.6M MgSO ₄ 0.1M Hepes 7.5 4% P400	0.6M MgSO ₄ 0.1M Hepes 7.5 4% MPD	0.1M Hepes 7.5 0.1M Tartrate 0.1M Li ₂ SO ₄	0.1M Li ₂ SO ₄ 0.1M Tris PH8.5 12% MPD	0.1M NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.1M Tris PH8.5 0.5M Na ₂ H ₂ O 5MK2H	0.1M Tris PH8.5 0.1M NaAc	0.1M Tris PH8.5 0.1M NaCl 12% P6000	0.1M NH ₄ H ₂ PO ₄ 0.1M Tris PH8.5 12% P6000	0.1M Tartrate 0.1M Tris PH8.5 0.4M MgSO ₄	0.1M Tris PH8.5 0.2M Li ₂ SO ₄	0.1M Tris PH8.5 0.5M As	0.1M Tris PH8.5 0.2M KI 20% PEG3350	0.1M Citrate Na 0.1M Tris PH8.5 5% P400
E	0.2M NaF 20% PEG3350	0.2M KF 20% PEG3350	0.2M (NH ₄)F 20% PEG3350	0.2M LiCl 20% PEG3350	0.2M MgCl ₂ 6H ₂ O 20% PEG3350	0.2M NaCl 20% PEG3350	0.2M CaCl ₂ 2H ₂ O 20% PEG3350	0.2M KCl 20% PEG3350	0.2M (NH ₄)Cl 20% PEG3350	0.2M NaI 20% PEG3350	0.2M KI 20% PEG3350	0.2M (NH ₄)Formate 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) 20% PEG3350
F	0.2M NaSCN 20% PEG3350	0.2M KSCN 20% PEG3350	0.2M LiNO ₃ 20% PEG3350	0.2M Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O 20% PEG3350	0.2M NaNO ₃ 20% PEG3350	0.2M KNO ₃ 20% PEG3350	0.2M (NH ₄)NO ₃ 20% PEG3350	0.2M Mg Formate 20% PEG3350	0.2M Na Formate 20% PEG3350	0.2M K Formate 20% PEG3350	0.2M (NH ₄)Formate 20% PEG3350	0.2M LiAc 2H ₂ O 20% PEG3350	0.2M LiAc 2H ₂ O 20% PEG3350
G	0.2M MgAc 4H ₂ O 20% PEG3350	0.2M ZnAc 2H ₂ O 20% PEG3350	0.2M NaAc 3H ₂ O 20% PEG3350	0.2M CaAc 2H ₂ O 20% PEG3350	0.2M KAc 20% PEG3350	0.2M (NH ₄)Ac 20% PEG3350	0.2M Li ₂ SO ₄ H ₂ O 20% PEG3350	0.2M MgSO ₄ 7H ₂ O 20% PEG3350	0.2M Na ₂ SO ₄ 10H ₂ O 20% PEG3350	0.2M K ₂ SO ₄ 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) ₂ SO ₄ 20% PEG3350	0.2M Na ₂ tartrate 20% PEG3350	0.2M Na ₂ tartrate 20% PEG3350
H	0.2M NaK tartrate 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) ₂ tartrate 20% PEG3350	0.2M NaH ₂ PO ₄ 20% PEG3350	0.2M Na ₂ HPO ₄ 20% PEG3350	0.2M KH ₂ PO ₄ 20% PEG3350	0.2M K ₂ HPO ₄ 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) ₂ HPO ₄ 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) ₂ HPO ₄ 20% PEG3350	0.2M Li-citrate 20% PEG3350	0.2M Na-citrate 20% PEG3350	0.2M K-citrate 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) ₂ H-citrate 20% PEG3350	0.2M (NH ₄) ₂ H-citrate 20% PEG3350

Conditions du criblage d'affinement :

```

<job name="Grid_G1.1_JA00R352_Index Screen" crystaltrak_version="2.2.8"
schema_version="1.0.0.1" Job_id="1.0.0.0" CrystalTrak_id="TBD">
  <sourceplates>
    <sourceplate name="" description="Grid Optimization: Grid_G1.1_JA00R352_Index
Screen" plateid="" tracking_id="" barcode="">
      <stocks>
        <stock name="polyethylene glycol 3350" pH="" volume="49.92"
vunits="ml" conc="50" cunits="w/v" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments=""
count="96"/>
        <stock name="sodium chloride" pH="" volume="4.80" vunits="ml"
conc="5" cunits="M" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments="" count="96"/>
        <stock name="tris hydrochloride" pH="7" volume="5.32"
vunits="ml" conc="1" cunits="M" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments=""
count="96"/>
        <stock name="water" pH="" volume="31.68" vunits="ml" conc="100"
cunits="v/v" viscosity="" volatility="" barcode="" comments="" count="96"/>
        <stock name="tris hydrochloride" pH="9.4" volume="4.28"
vunits="ml" conc="1" cunits="M" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments=""
count="72"/>
      </stocks>
    </plate>
    <wells volume="1" vunits="ml">
      <stock name="polyethylene glycol 3350" pH="" conc="50"
cunits="w/v" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments="">
        <well name="A1" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="A2" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="A3" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="A4" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="A5" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="A6" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="A7" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="A8" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="A9" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="A10" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="A11" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="A12" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="B1" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="B2" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="B3" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="B4" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="B5" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="B6" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="B7" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="B8" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="B9" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="B10" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="B11" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="B12" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="C1" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="C2" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="C3" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="C4" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="C5" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="C6" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="C7" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="C8" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="C9" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="C10" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="C11" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="C12" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="D1" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="D2" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="D3" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="D4" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="D5" volume="568.00" vunits="ul"/>
        <well name="D6" volume="600.00" vunits="ul"/>
        <well name="D7" volume="440.00" vunits="ul"/>
        <well name="D8" volume="472.00" vunits="ul"/>
        <well name="D9" volume="504.00" vunits="ul"/>
        <well name="D10" volume="536.00" vunits="ul"/>
        <well name="D11" volume="568.00" vunits="ul"/>
      </stock>
    </wells>
  </sourceplate>
</sourceplates>

```

```
<well name="D12" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="E1" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="E2" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="E3" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="E4" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="E5" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="E6" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="E7" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="E8" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="E9" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="E10" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="E11" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="E12" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="F1" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="F2" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="F3" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="F4" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="F5" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="F6" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="F7" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="F8" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="F9" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="F10" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="F11" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="F12" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="G1" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="G2" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="G3" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="G4" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="G5" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="G6" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="G7" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="G8" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="G9" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="G10" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="G11" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="G12" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="H1" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="H2" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="H3" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="H4" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="H5" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="H6" volume="600.00" vunits="ul"/>
<well name="H7" volume="440.00" vunits="ul"/>
<well name="H8" volume="472.00" vunits="ul"/>
<well name="H9" volume="504.00" vunits="ul"/>
<well name="H10" volume="536.00" vunits="ul"/>
<well name="H11" volume="568.00" vunits="ul"/>
<well name="H12" volume="600.00" vunits="ul"/>
</stock>
<stock name="sodium chloride" pH="" conc="5" cunits="M"
viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments="">
<well name="A1" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="A2" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="A3" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="A4" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="A5" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="A6" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="A7" volume="40.00" vunits="ul"/>
<well name="A8" volume="40.00" vunits="ul"/>
<well name="A9" volume="40.00" vunits="ul"/>
<well name="A10" volume="40.00" vunits="ul"/>
<well name="A11" volume="40.00" vunits="ul"/>
<well name="A12" volume="40.00" vunits="ul"/>
<well name="B1" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="B2" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="B3" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="B4" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="B5" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="B6" volume="20.00" vunits="ul"/>
<well name="B7" volume="40.00" vunits="ul"/>
```



```
<well name="H7" volume="80.00" vunits="ul"/>
<well name="H8" volume="80.00" vunits="ul"/>
<well name="H9" volume="80.00" vunits="ul"/>
<well name="H10" volume="80.00" vunits="ul"/>
<well name="H11" volume="80.00" vunits="ul"/>
<well name="H12" volume="80.00" vunits="ul"/>
</stock>
<stock name="tris hydrochloride" pH="7" conc="1"
cunits="M" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments="">
  <well name="A1" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A2" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A3" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A4" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A5" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A6" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A7" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A8" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A9" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A10" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A11" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="A12" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="B1" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B2" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B3" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B4" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B5" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B6" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B7" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B8" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B9" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B10" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B11" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="B12" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="C1" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C2" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C3" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C4" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C5" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C6" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C7" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C8" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C9" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C10" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C11" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="C12" volume="36.70" vunits="ul"/>
  <well name="D1" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D2" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D3" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D4" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D5" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D6" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D7" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D8" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D9" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D10" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D11" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="D12" volume="7.30" vunits="ul"/>
  <well name="E1" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E2" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E3" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E4" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E5" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E6" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E7" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E8" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E9" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E10" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E11" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="E12" volume="100.00" vunits="ul"/>
  <well name="F1" volume="77.50" vunits="ul"/>
  <well name="F2" volume="77.50" vunits="ul"/>
```

```
<well name="F3" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F4" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F5" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F6" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F7" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F8" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F9" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F10" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F11" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="F12" volume="77.50" vunits="ul"/>
<well name="G1" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G2" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G3" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G4" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G5" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G6" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G7" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G8" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G9" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G10" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G11" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="G12" volume="36.70" vunits="ul"/>
<well name="H1" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H2" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H3" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H4" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H5" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H6" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H7" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H8" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H9" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H10" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H11" volume="7.30" vunits="ul"/>
<well name="H12" volume="7.30" vunits="ul"/>
</stock>
<stock name="tris hydrochloride" pH="9.4" conc="1"
cunits="M" viscosity="5" volatility="50" barcode="" comments="">
<well name="B1" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B2" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B3" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B4" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B5" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B6" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B7" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B8" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B9" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B10" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B11" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="B12" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="C1" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C2" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C3" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C4" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C5" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C6" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C7" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C8" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C9" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C10" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C11" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="C12" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="D1" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D2" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D3" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D4" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D5" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D6" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D7" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D8" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D9" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D10" volume="92.70" vunits="ul"/>
```

```
<well name="D11" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="D12" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="F1" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F2" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F3" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F4" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F5" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F6" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F7" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F8" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F9" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F10" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F11" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="F12" volume="22.50" vunits="ul"/>
<well name="G1" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G2" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G3" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G4" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G5" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G6" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G7" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G8" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G9" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G10" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G11" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="G12" volume="63.30" vunits="ul"/>
<well name="H1" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H2" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H3" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H4" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H5" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H6" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H7" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H8" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H9" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H10" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H11" volume="92.70" vunits="ul"/>
<well name="H12" volume="92.70" vunits="ul"/>
</stock>
<stock name="water" pH="" conc="100" cunits="v/v"
viscosity="" volatility="" barcode="" comments="">
  <well name="A1" volume="440.00" vunits="ul"/>
  <well name="A2" volume="408.00" vunits="ul"/>
  <well name="A3" volume="376.00" vunits="ul"/>
  <well name="A4" volume="344.00" vunits="ul"/>
  <well name="A5" volume="312.00" vunits="ul"/>
  <well name="A6" volume="280.00" vunits="ul"/>
  <well name="A7" volume="420.00" vunits="ul"/>
  <well name="A8" volume="388.00" vunits="ul"/>
  <well name="A9" volume="356.00" vunits="ul"/>
  <well name="A10" volume="324.00" vunits="ul"/>
  <well name="A11" volume="292.00" vunits="ul"/>
  <well name="A12" volume="260.00" vunits="ul"/>
  <well name="B1" volume="440.00" vunits="ul"/>
  <well name="B2" volume="408.00" vunits="ul"/>
  <well name="B3" volume="376.00" vunits="ul"/>
  <well name="B4" volume="344.00" vunits="ul"/>
  <well name="B5" volume="312.00" vunits="ul"/>
  <well name="B6" volume="280.00" vunits="ul"/>
  <well name="B7" volume="420.00" vunits="ul"/>
  <well name="B8" volume="388.00" vunits="ul"/>
  <well name="B9" volume="356.00" vunits="ul"/>
  <well name="B10" volume="324.00" vunits="ul"/>
  <well name="B11" volume="292.00" vunits="ul"/>
  <well name="B12" volume="260.00" vunits="ul"/>
  <well name="C1" volume="440.00" vunits="ul"/>
  <well name="C2" volume="408.00" vunits="ul"/>
  <well name="C3" volume="376.00" vunits="ul"/>
  <well name="C4" volume="344.00" vunits="ul"/>
  <well name="C5" volume="312.00" vunits="ul"/>
  <well name="C6" volume="280.00" vunits="ul"/>
```


Annexe H :

Leclercq, S., Derouaux, A., Olatunji, S., Fraipont, C., Egan, A.J.F., Vollmer, W., Breukink, E. & Terrak, M., (2017) Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis. *Sci. Rep.*7, 43306.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis

Received: 01 November 2016

Accepted: 06 January 2017

Published: 24 February 2017

Sophie Leclercq¹, Adeline Derouaux¹, Samir Olatunji¹, Claudine Fraipont¹, Alexander J. F. Egan², Waldemar Vollmer², Eefjan Breukink³ & Mohammed Terrak¹

Bacteria utilize specialized multi-protein machineries to synthesize the essential peptidoglycan (PG) cell wall during growth and division. The divisome controls septal PG synthesis and separation of daughter cells. In *E. coli*, the lipid II transporter candidate FtsW is thought to work in concert with the PG synthases penicillin-binding proteins PBP3 and PBP1b. Yet, the exact molecular mechanisms of their function in complexes are largely unknown. We show that FtsW interacts with PBP1b and lipid II and that PBP1b, FtsW and PBP3 co-purify suggesting that they form a trimeric complex. We also show that the large loop between transmembrane helices 7 and 8 of FtsW is important for the interaction with PBP3. Moreover, we found that FtsW, but not the other flippase candidate MurJ, impairs lipid II polymerization and peptide cross-linking activities of PBP1b, and that PBP3 relieves these inhibitory effects. All together the results suggest that FtsW interacts with lipid II preventing its polymerization by PBP1b unless PBP3 is also present, indicating that PBP3 facilitates lipid II release and/or its transfer to PBP1b after transport across the cytoplasmic membrane. This tight regulatory mechanism is consistent with the cell's need to ensure appropriate use of the limited pool of lipid II.

Most bacteria surround their cytoplasmic membrane with a peptidoglycan (PG) sacculus which protects the cell from bursting due to the turgor and maintains cell shape. In order to propagate, bacteria have to enlarge and divide their cell envelope including their PG sacculus¹. These processes are performed by specialized multiprotein complexes, the elongasome and divisome; each of them contains all the enzymatic activities required for the synthesis of new PG material and its insertion into the cell wall². The substrate for PG synthesis is the precursor lipid II, which is synthesized on the inner face of the cytoplasmic membrane and subsequently translocated through the membrane by a flippase (FtsW and/or MurJ)^{3–5}. Once on the periplasmic side of the membrane, lipid II is polymerized by the glycosyltransferase (GT) and the transpeptidase (TP, the target of penicillin) activities of the penicillin-binding proteins (PBPs)^{6,7} in coordination with interacting proteins of their respective networks, allowing growth and division of the bacterial cell².

The divisome controls septal PG synthesis at mid-cell and its differentiation into the new poles of daughter cells. The components of the divisome span the cytoplasm, the cytoplasmic membrane, the periplasm and the outer membrane (in Gram-negative bacteria) and communicate by dynamic protein-protein interactions through these cell compartments. This organization allows the coordination between the cytoskeleton and the synthesis of precursors in the cytoplasm, their transport across the cytoplasmic membrane and septal peptidoglycan synthesis, and, in Gram-negative bacteria, the coordination with outer membrane invagination^{8,9}. In *Escherichia coli*, the divisome includes over 20 proteins which assemble in an ordered and interdependent manner in two steps¹⁰: first, the tubulin-like FtsZ, ZipA, FtsA, ZapA-E and FtsEX localize at mid-cell underneath the cytoplasmic membrane. Later, the downstream components FtsK, FtsQ-FtsL-FtsB, FtsW-FtsI (PBP3) and FtsN join sequentially, some as preformed subcomplexes^{11,12}, to form the mature divisome¹³. The bifunctional PG GTase/TPase PBP1b and its

¹Centre d'Ingénierie des Protéines, University of Liège, B6a, Quartier Agora, allée du six Août 11, 4000 Liège 1, Belgium. ²Institute for Cell and Molecular Biosciences, The Centre for Bacterial Cell Biology, Newcastle University, Richardson Road, Newcastle upon Tyne, NE2 4AX, UK. ³Membrane Biochemistry and Biophysics, Department of Chemistry, Faculty of Science, Utrecht University, Padualaan 8, 3584 CH Utrecht, The Netherlands. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.T. (email: mterrak@ulg.ac.be)

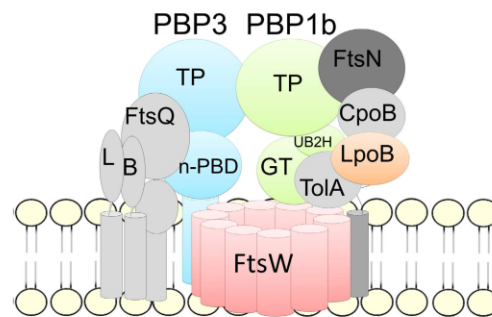


Figure 1. Schematic representation of the septal peptidoglycan synthesis core of the divisome. The proteins studied in this paper are shown in color, the others are in grey. TP, transpeptidase domain; GT, glycosyltransferase domain; L, FtsL; B, FtsB; n-PBD, non-penicillin binding domain.

regulators (LpoB, CpoB, TolA) also associate with the divisome. PBP1b requires the PG TPase PBP3 which itself requires FtsW for septal localization^{14,15}. PBP3 interacts *in vitro* with FtsW¹², PBP1b¹⁵, and FtsN¹⁶ and with other proteins of the divisome². Bacterial two-hybrid (BATH) analysis also revealed an interaction between PBP1b and FtsW¹². FtsW is a polytopic membrane protein that belongs to the SEDS (shape, elongation, division, and sporulation) family and plays an essential role in cell division. It was shown to transport lipid II across membranes *in vitro*³. The inability of FtsW to transport bulky lipid II variants suggests the presence of a size-restricting pore that accommodates lipid II during transport¹⁷. Moreover, mutagenesis studies of FtsW showed that residues R145 and K153 of the transmembrane segment (TM) 4 are essential for flippase activity and the mutated proteins were incapable to rescue a conditional FtsW mutant strain¹⁷. The periplasmic loop (E240-A249) between transmembrane helices (TMs) 7 and 8 is essential for septal PG assembly and the loop between TMs 9 and 10 is required for the localization of PBP3 at the septum¹⁸.

A second candidate protein proposed to flip lipid II, MurJ, belongs to the multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily^{4,19}. MurJ is essential for viability and peptidoglycan synthesis in *E. coli*. The heterologous expression of the O-antigen flippase Wzk from *Helicobacter pylori* in *E. coli* was able to complement the loss of MurJ²⁰. A recently proposed third flippase candidate, Amj of *Bacillus subtilis*, is the founding member of new membrane protein family²¹. It was recently reported that the SEDS protein RodA is essential for viability of a *B. subtilis* mutant lacking all class A PBPs, and has a GTase activity²². Hence, different roles for these different families of integral membrane proteins involved with PG growth have been proposed, showing the need to clarify their precise biochemical activities.

Several PG enzymes are known to engage in functional interactions with divisome proteins. PBP1b is stimulated by FtsN and the outer membrane (OM) lipoprotein LpoB, which binds to its UB2H domain^{16,23–25}, and the dynamic interactions between LpoB, CpoB and TolA with PBP1b facilitate the coordination between PG synthesis and OM invagination⁸. FtsQ, FtsL and FtsB associate in a stable ternary complex¹¹ but their exact roles are unknown. FtsN is the last protein to localize to the division site and interacts with PBP1b, PBP3, FtsQ and FtsW^{2,16}. It is believed to play an important role in the stability of the divisome and the initiation of the cell envelope constriction by activating septal PG synthesis through its interactions with FtsA and FtsQLB^{26,27}. Large complexes containing more than two divisome proteins have been isolated in a few cases, the largest being a 1 MDa complex containing FtsZ, ZipA, FtsK, FtsQLB, and FtsN from *E. coli*²⁸. In another study the proteins DivIB, DivIC, FtsL, PBP2x and FtsW from *Streptococcus pneumoniae* were co-expressed in *E. coli* and complexes composed of up to five proteins were isolated²⁹.

While it is now evident that the PG synthase activities are regulated within the divisome and coordinated with the progression of the cell cycle through protein-protein interactions, the molecular mechanisms of these processes remain largely unknown. The *E. coli* septum PG synthesis components of the divisome includes FtsQ-FtsL-FtsB, FtsW-PBP3, PBP1b, FtsN, LpoB, CpoB and TolA (Fig. 1). In this work, we have investigated the divisome enzymes directly involved in septum synthesis, the synthases PBP1b and PBP3 and the lipid II flippase candidate FtsW, with the aim to understand how the interactions between them regulate the PG synthesis activities.

Results

FtsW, PBP3 and PBP1b form a ternary complex *in vitro*. As a transporter candidate, FtsW is probably the last protein to interact with lipid II before its polymerization by the glycosyltransferase activity of a bifunctional PBP. PBP1b localizes to the septum and interacts with several divisome proteins and thus, it is likely to be the first enzyme to process lipid II after its translocation during cell division. PBP3 forms a complex with FtsW and its specific transpeptidase activity is essential for cell division. Binary interactions between FtsW, PBP3 and PBP1b have been shown by the bacterial two hybrids (BATH) system^{15,30,31} and confirmed *in vitro*^{12,15} except for the interaction between PBP1b and FtsW that was only shown by BATH¹². We sought to complete the characterization of this protein triplet by analyzing the interaction between PBP1b and FtsW *in vitro* and to isolate the

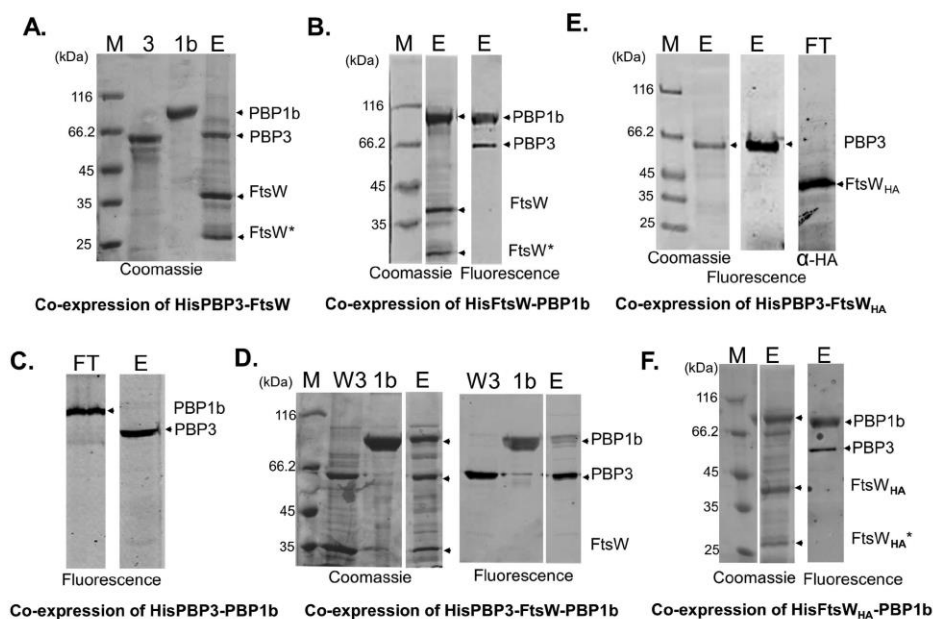


Figure 2. Interactions between FtsW, PBP3 and PBP1b. The proteins were co-expressed in *E. coli* cells; one contains a His-Tag and was used as bait while the other proteins are untagged. The co-expressed proteins are indicated below each panel. The expressed protein cannot be detected in the total extract but only after affinity purification. The cytoplasmic membranes from cells expressing the indicated proteins were solubilized with detergent followed by a purification step over a Ni-affinity column. The eluted fractions or flow-through fractions were labeled by fluorescent ampicillin and analyzed by SDS-PAGE. The gels were first subjected to fluorescence imaging followed by Coomassie blue staining. 3, 1b and W3 indicate lanes with purified PBP3, PBP1b and FtsW-PBP3, respectively (size controls). Lanes E depict elution fractions from the Ni-affinity columns and FT the flow-through. M, protein standards. The bands of PBP1b, PBP3 and FtsW are indicated on the right side of the gels. FtsW* indicates an FtsW degradation product. In panel E, the flow-through fraction (FT) was analyzed by immunoblotting using antibodies against the epitope HA to detect FtsW_{HA}.

ternary complex. The proteins were co-expressed in *E. coli* followed by affinity co-purification with one of the two proteins containing an N-terminal His-tag (bait) and the second one left untagged (prey). It is noteworthy that the latter method was found to be more efficient in the detection of complexes than the purification of the separate proteins followed by reconstitution *in vitro*. This might be due to the fact that once a sufficiently stable complex is formed it can be solubilized without dissociating while, when the proteins are solubilized separately, the detergent might interfere with some of the interactions. The co-expression system was first tested using PBP3 and FtsW that were previously shown to form a sub-complex¹². After co-expression and membrane solubilization with detergent (DDM) the proteins were loaded on a Nickel affinity column followed by washing steps and imidazole elution. The fractions were then analyzed using SDS-PAGE and fluorescent-ampicillin to label the PBPs. As expected, the results show that PBP3 and FtsW co-eluted (Fig. 2A), confirming their interaction. The same strategy was then applied to the HisFtsW-PBP1b and HisPBP3-PBP1b pairs. We found that HisFtsW and PBP1b co-eluted (Fig. 2B). However, in the case of HisPBP3-PBP1b only tagged PBP3 was recovered after elution, and PBP1b was found in the flow through (Fig. 2C). These results show, firstly, that untagged PBP1b does not bind nonspecifically to the column in the absence of interacting partner and therefore, that FtsW and PBP1b interact specifically. Secondly, the absence of detectable interaction between PBP1b and PBP3 by this method is probably due to weak and/or dynamic interaction between the two proteins. This conclusion is consistent with previous results showing that co-immunoprecipitation of PBP1b and PBP3 occurs after cross-linking¹⁵. Consequently, we conclude that the FtsW-PBP3 and FtsW-PBP1b interactions are stronger or less dynamic than the PBP1b-PBP3 interaction. Interestingly, labelling of the PBPs with fluorescent ampicillin after elution revealed that the native *E. coli* PBP3 co-purified with HisFtsW-PBP1b (Fig. 2B). This result was confirmed by the co-expression and co-purification of HisPBP3, FtsW and PBP1b, which confirmed the co-elution of the three proteins (Fig. 2D). Since PBP1b was not retained with HisPBP3 but only when FtsW was co-expressed, this suggests that PBP1b

is bound to the ternary complex via FtsW. The construct of PBP1b also contained FtsN but this protein did not co-elute with the three proteins, suggesting that its interactions with the ternary complex is weak.

The loop between TM 7 and 8 of FtsW is essential for the formation of the FtsW-PBP3 complex.

The first 56 N-terminal amino acids of PBP3, containing the transmembrane (TM) segment, are essential for its localization and for the interaction with the TMs of FtsW^{32,33}. A model of the interaction between the TMs of FtsW and PBP3 was proposed using a co-evolutionary approach³⁴. In addition, the loop between TM9 and 10 of FtsW is involved in the interaction with PBP3 and PBP1b^{12,18}. Mutagenesis studies in the large loop between TM7 and 8 implied its importance for the function of FtsW, but the exact role was not determined^{18,35}. The insertion of the 9 amino acid hemagglutinin (HA) peptide in the TM7/8 loop between residues 293–294 of FtsW yields a functional protein (FtsW_{HA}) as shown by *in vivo* complementation¹⁸. However, when FtsW_{HA} was co-expressed with HisPBP3, only tagged PBP3 was recovered during the elution step (Fig. 2E) (under the same conditions, wild-type FtsW forms a stable complex with PBP3 (Fig. 2A)). This indicates that the binding between the two proteins was affected by the insertion of the HA peptide and that the TM7/8 loop is crucial for a strong interaction with PBP3. Since the PBP3-PBP1b and PBP3-FtsW_{HA} interactions are too weak to observe pairwise complexes using the co-expression/co-purification method, we hypothesized that the simultaneous interaction of PBP3 with PBP1b and FtsW_{HA} might stabilize a ternary complex. Indeed, when HisFtsW_{HA} and PBP1b were co-expressed and co-purified, the two proteins co-eluted with PBP3 (Fig. 2F), supporting our hypothesis and confirming the presence of a ternary complex and not of two subpopulations of FtsW-PBP1b and FtsW-PBP3 complexes. To our knowledge, this is the first time that such a complex was isolated, suggesting that the transport of the lipid II precursor is coupled with its polymerization and insertion into the cell wall.

FtsW inhibits lipid II polymerization by PBP1b if not in complex with PBP3.

In *E. coli*, the complex formed by PBP1b, PBP3 and FtsW constitutes the core-enzyme of the divisome that interacts with the lipid II substrate. In order to understand the effect of the interactions between these proteins on lipid II polymerization we analyzed the activity of PBP1b alone and in the presence of either FtsW or PBP3, or of the complex FtsW-PBP3. The glycosyltransferase activity of *E. coli* PBP1b was monitored by the continuous fluorescence method using dansyl lipid II as substrate^{36,37}. The polymerase reaction is accompanied by a decrease in the fluorescence signal as a function of time. However, when FtsW from *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* or *Salmonella enterica* were added to the reaction mixture, the GT activity of PBP1b was inhibited in a concentration-dependent manner (Fig. 3A). Under the same conditions, PBP3 from *E. coli* slightly lowered the activity of PBP1b (Fig. 3B). Remarkably, the inhibitory effect of FtsW was suppressed in the presence of the co-purified *E. coli* FtsW-PBP3 complex and the activity of PBP1b was restored to a level close to that of PBP1b alone (Fig. 3B). FtsW inhibition could be the result of direct interaction with PBP1b or lipid II as FtsW potentially interacts with both.

The lipoprotein LpoB interacts with PBP1b and stimulates its activity^{23–25}. In order to test whether PBP1b activation by LpoB could reverse the inhibitory effect of FtsW on lipid II polymerization by PBP1b, the experiment was performed in the presence of LpoB. As previously published, LpoB activated the GT activity of PBP1b. FtsW was still able to inhibit PBP1b in the presence of LpoB (Fig. 3C).

The GT and TPase activity of class A PBPs is coupled^{38,39}, and under certain conditions the stimulated PBP domain can perform carboxypeptidase (CPase) reactions⁴⁰, thus we sought to test whether the inhibition of GTase activity by FtsW leads to a concomitant decrease in TPase/CPase activity by analyzing the composition of the PG produced. Indeed, after a 2 h incubation period with radioactive lipid II the total TPase/CPase activity of PBP1b was reduced by FtsW in a concentration dependent manner. Consistent with the GTase data this inhibitory effect was relieved by the presence of PBP3 (Fig. 3D). The same trend was observed in PG produced by PBP1b in the presence of LpoB, although in this experiment the presence of PBP3 did not fully restore peptide cross-linking to the uninhibited levels.

Interaction of FtsW with lipid II and its modulation by PBP3.

A second polymerase assay based on SDS-PAGE and radioactive lipid II was used to further analyze the effect of FtsW and PBP3 on lipid II polymerization by PBP1b. This assay allows the visualization of unused lipid II and the evaluation of the polymer glycan chain length when the TPase active site is inactivated (by the S510A mutation in PBP1bTP* or by penicillin). When both the GTase and TPase are active, the PG does not penetrate the gel, which indicates that it has been cross-linked (Fig. 4A). The PBP1bTP* activity was partially inhibited by addition of FtsW; the glycan chains formed were shorter when compared to the products of PBP1bTP* alone (Fig. 4A). Addition of PBP3 also resulted in a shortening of glycan chains but to a lesser extent than with FtsW (Fig. 4A). Moreover, we observed that FtsW modifies the mobility of lipid II in the gel while the FtsW-PBP3 complex had no effect on the activity of PBP1b or the mobility of lipid II (Fig. 4A and B). Similarly, the addition of FtsW to lipid II in the absence of PBP1b reduced the electrophoretic motility of lipid II in the gel, compared to its migration near the gel front in the sample with the FtsW-PBP3 complex (Fig. 4B). Coomassie staining of the gel shows the co-migration of FtsW and the fluorescent lipid II (Fig. 4C) suggesting a direct interaction between lipid II and FtsW. To further confirm this interaction, we used native PAGE. Interestingly, we found that the mobility of lipid II pre-incubated with FtsW was also affected under native conditions, and that the FtsW-PBP3 complex or MurJ had no effect on the mobility of lipid II (Fig. 4D) showing that the interaction between FtsW and lipid II is specific. These results are consistent with the observation that overproduction of FtsW arrests cell growth⁴¹. We also observed that high induction of FtsW arrests cell growth at an OD of ~1.5 but when FtsW-PBP3 was overexpressed, cells continue to grow (Fig. S2).

All together our results provide evidence for a direct interaction between lipid II and FtsW and suggest that this interaction is responsible for the inhibition of PBP1b-catalyzed lipid II polymerization by FtsW. Moreover,

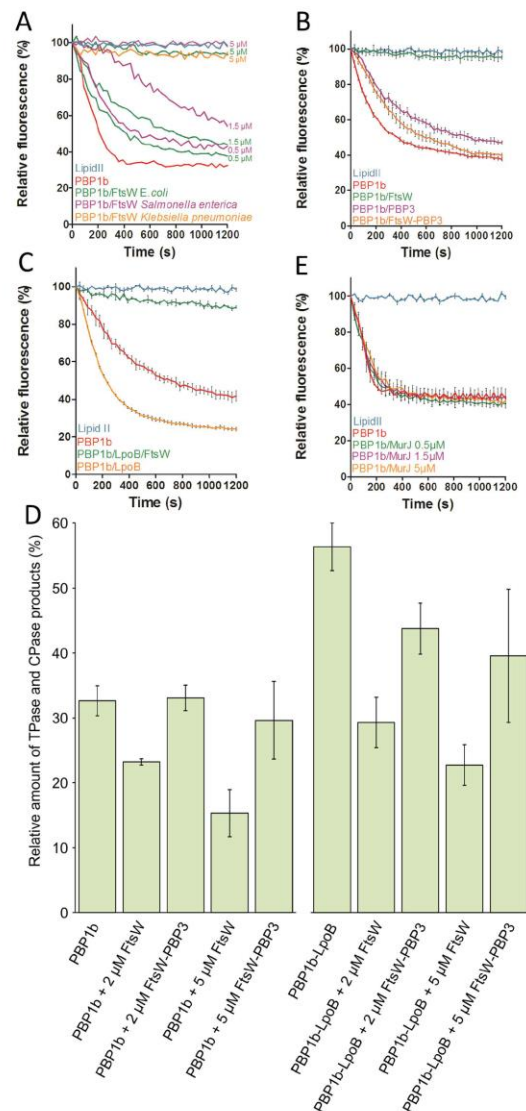


Figure 3. Effect of FtsW, PBP3 and the FtsW-PBP3 complex on the activities of PBP1b. (A–C) Continuous fluorescence assay to measure the polymerization (GT activity) with dansyl-lipid II. The fluorescence decreases over time upon polymerization of dansyl-lipid II by PBP1b. A. inhibition of lipid II polymerization by FtsW from *E. coli*, *S. enterica* and *K. pneumoniae*. (B) In contrast to FtsW (5 μ M), the polymerase activity of PBP1b is not inhibited by the FtsW-PBP3 complex (5 μ M) and slightly decreases in the presence of PBP3 (5 μ M). (C) PBP1b activation by LpoB (200 nM) does not suppress the inhibitory effect of FtsW (5 μ M). (D) Effect of FtsW and the FtsW-PBP3 complex on TPase activity of PBP1b. The percentage of mucopeptide products detected by HPLC analysis of PG produced *in vitro* by PBP1b in the presence of the proteins indicated beneath each bar (endpoint assay). Total TPase activity is the sum of activities derived from the TPase domain of PBP1b, including peptide cross-linking and carboxypeptidase activities. Values are the mean \pm SD of three experiments. Examples of the corresponding HPLC chromatograms are depicted in Supplemental Figure S1. The effects of FtsW and FtsW-PBP3 on PBP1b's PBP domain parallel the effects on GTase in A, consistent with the coupling of both domains. E. In contrast to FtsW, MurJ (0.5–5 μ M) has no effect on the polymerase activity of PBP1b.

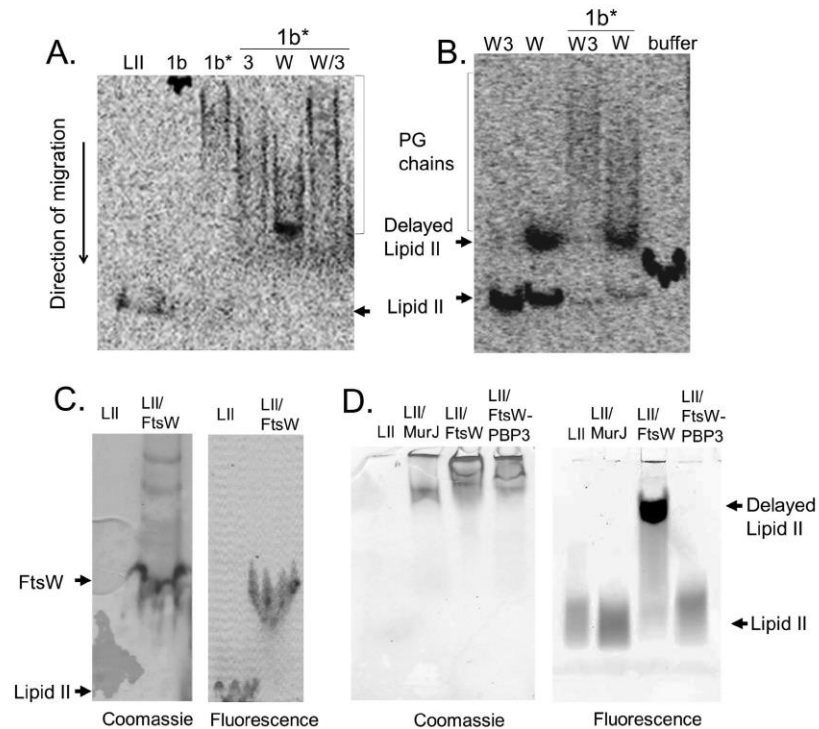


Figure 4. Effect of FtsW, PBP3 and the FtsW-PBP3 complex on the polymerization of lipid II by PBP1b and the mobility of lipid II (LII) analyzed by (SDS- or native) PAGE. (A and B) radioactive lipid II revealed by storage phosphor imaging using Typhoon trio+ (GE Health Care). (A) SDS-PAGE analysis of PBP1b (1b) or PBP1bTP* mutant (1b*) (both at 100 nM) reaction products in the presence of PBP3 (3) (3 μ M), FtsW (W) (3 μ M), and the FtsW-PBP3 (W3) complex (3 μ M). (B) effect of FtsW (3 μ M) and the FtsW-PBP3 complex (3 μ M) in the absence of PBP1b on the mobility of lipid II; buffer with excess detergent used as control. (C) Co-migration of FtsW and NBD-lipid II in SDS-PAGE. (D) analysis of NBD-lipid II (10 μ M) migration by native-PAGE in the absence and the presence of FtsW, the FtsW-PBP3 complex or MurJ (all used at 5 μ M). (C and D) fluorescent lipid II was first revealed by fluorescence imaging using Typhoon trio+, then the gels were stained with Coomassie blue.

the results also indicate that the interaction of FtsW with PBP3 modulates the interaction of the transporter candidate with its lipid II substrate.

While we have observed an interaction of *E. coli* FtsW with lipid II, this protein and two orthologues (*K. pneumoniae* FtsW or *Salmonella enterica* FtsW) were unable to catalyze the GTase reaction *in vitro* (Fig. 5). No polymerase activity was observed with FtsW-PBP3 complex either (Fig. 5A and Fig. S1). This contrasts the recent findings of a weak GT activity of a partially purified RodA protein from *B. subtilis*²² and the proposed *in vivo* GTase activity of *E. coli* RodA⁴². Our data suggest that in *E. coli* the GTase activity might be provided by the bi-functional class A PBPs and not by the two SEDS proteins, FtsW and RodA.

MurJ does not affect lipid II polymerization by PBP1b. The identity of the lipid II flippase is currently a matter of debate⁵. In *E. coli*, the SEDS proteins (FtsW and RodA) and MurJ were proposed as lipid II flippases³⁴. The previous studies focused on the transport function of FtsW and MurJ using different *in vitro* and *in vivo* experiments, respectively. However, the different approaches did not produce consistent results to end the controversies about the identity of the lipid II transporter, which remains an open question. In this study, we have investigated the effect of MurJ on lipid II polymerization by PBP1b as described above for FtsW. We assumed that if MurJ is a lipid II transporter, it should interact with its substrate and thus could affect the activity of PBP1b as was observed with FtsW. When MurJ was added to the fluorescence assay containing PBP1b and dansyl lipid II, we found that, in contrast to the three different FtsW orthologues tested, MurJ has no effect on the polymerization of lipid II by PBP1b (Fig. 3E). Moreover, when MurJ was incubated with lipid II it did not exhibit any effect on

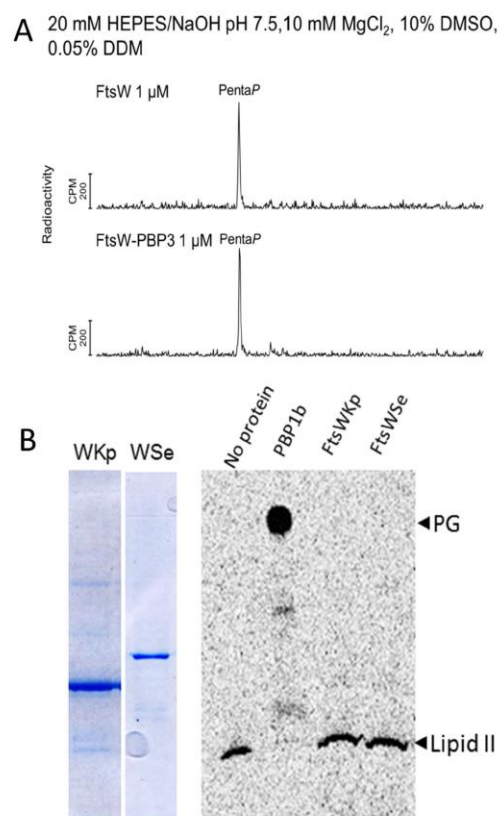


Figure 5. Analysis of the reactivity of FtsW with lipid II. (A) HPLC chromatograms of the reaction products of radioactive lipid II incubated with *E. coli* FtsW or FtsW-PBP3. (B) right, TLC analysis of reaction products from radioactive lipid II incubated with FtsWKp or FtsWSe. Lipid II without protein and peptidoglycan (PG) synthesis by PBP1b is shown as control. Left, SDS-PAGE showing the purified *K. pneumoniae* FtsW (WKp) and *S. enterica* FtsW (WSe).

the lipid II mobility in a native gel (Fig. 4D). These results suggest that MurJ may not interact directly with lipid II and may require unknown factors should it be a lipid II flippase. As FtsW and MurJ are both integral membrane proteins and were solubilized with the same detergent, our data highlight the specificity of the effect of FtsW on lipid II polymerization by PBP1b.

Discussion

New insights from FtsW-PBP3/PBP1b interactions suggest a functional coordination. In this work we have investigated the activities and interactions of core peptidoglycan synthesis proteins of the *E. coli* divisome. Our results show that PBP1b, PBP3 and FtsW form a ternary complex *in vitro*. Such a complex contains the necessary enzymatic activities to build the septum peptidoglycan, namely the GTase and TPase activities for glycan chain elongation and peptide cross-linking, respectively, provided by the bifunctional PBP1b and the division specific TPase activity of PBP3, in addition to the potential flippase activity of FtsW. This reinforces the idea that the three proteins work together during division in coordination with other divisome proteins. Our data is consistent with previous protein-protein interaction and localization data^{2,8} and support the hypothesis that class A and class B PBPs (here PBP1b and PBP3) participate in multi-enzyme complexes^{43,44}. *E. coli* and other bacteria, require at least one class A PBP (PBP1a or PBP1b) for viability^{45,46}. PBP1b can be replaced by PBP1a and therefore the latter is likely to be also recruited at the division site under specific control of the divisome.

We infer that our method of co-expression/-purification would detect only strong and stable interactions between proteins. Comparing the data from different overexpression pairs provided new insights into the stability of the interactions observed. The FtsW-PBP3 and FtsW-PBP1b complexes were readily isolated suggesting that

they are maintained by considerably stronger interactions than those between PBP1b and PBP3. Consequently, PBP1b is likely recruited to the division site by the FtsW-PBP3 complex by multiple and simultaneous interactions, consistent with its PBP3-dependent mid-cell localization¹⁵. The loop between TM9 and 10 of FtsW is necessary for interaction with PBP3¹⁸ and may also be involved in the interaction with PBP1b¹². The largest periplasmic loop between TM7 and 8 (~66 residues) of FtsW is crucial for the function of the protein¹⁸. We showed here that the modification of this loop decreased the binding of FtsW_{HA} to PBP3 to a point where the complex could no longer be detected, but the formation of the FtsW_{HA}-PBP1b complex was not affected. These observations indicate that the loop between TM7 and 8 contributes to the interaction of FtsW with PBP3 but does not seem to play a role in the interaction with PBP1b. This is consistent with interaction studies between FtsW and PBP3 from *Mycobacterium tuberculosis* showing that the last two extracellular loops between TM 7/8 and TM 9/10 of FtsW also play important role in the binding of PBP3⁴⁷.

PBP3 modulates the interaction between FtsW and lipid II. The finding of the inhibitory effect of FtsW on the polymerization of lipid II by *E. coli* PBP1b, the suppression of the inhibitory effect of FtsW by PBP3, together with the interaction of FtsW with lipid II, strongly suggest a regulation mechanism of FtsW involving PBP3. Based on these results, we propose: (i) that FtsW alone interacts with high affinity with lipid II and prevents its polymerization by PBP1b, (ii) that the interaction of PBP3 with FtsW modulates the interaction between FtsW and lipid II so that the latter becomes accessible to PBP1b. The interaction of PBP3 with FtsW may induce a conformational change in FtsW that facilitates the release of lipid II and/or its transfer to PBP1b. FtsW and PBP3 are expressed at similar levels in cells and the two proteins form a complex prior to their localization at the division site, hence, only the active FtsW-PBP3 complex might be present *in vivo*. This is consistent with the observation that overproduction of FtsW inhibits cell growth⁴¹, in contrast, the overexpression of FtsW-PBP3 had no effect on the cell growth. The effect of overexpressed FtsW on cell growth may be the consequence of the sequestration of lipid II by the overexpressed protein. Thus, sequestration of lipid II when FtsW is overexpressed and its recovered availability when both FtsW and PBP3 are overexpressed seem to also happen *in vivo*.

In our study we have observed an interaction of *E. coli* FtsW with lipid II but this protein, and two analogs (FtsW_{Kp} and FtsW_{Se}), were devoid of any GT activity. This contrasts the observed activity of RodA from *B. subtilis*²². These marked differences indicate that in *E. coli*, where at least one class A PBP is essential for viability, the GTase activity might be provided by the bi-functional class A PBPs and not by the two SEDS proteins, FtsW and RodA. Moreover, the activity data, together with the interaction detected between PBP1b and several divisome proteins, argue against the recent suggestion⁴² that the class A PBPs work 'semi-autonomously' outside the divisome/elongosome complexes and that the GT activity is provided by the SEDS proteins. In our view, other SEDS proteins need to be purified and systematically tested for GTase activity, lipid II binding and flippase activity to clarify these contradicting results and help better understand the function of these proteins in PG synthesis and cell morphogenesis. More effort should be put into the determination of the structure of SEDS protein, which could provide an insight on their function.

Based on our results and published data we propose a model where FtsW is a flippase interacting with its substrate, lipid II and that this interaction is regulated by PBP3 (see below).

Model of FtsW function and its regulation by PBP3. The potential transport function of FtsW was proposed to be mediated by a pore-like structure¹⁷. The large loop between TM7 and 8 could thus play a regulatory role by an open/close mechanism of the pore's gate from the periplasmic side. As this loop interacts with PBP3, possibly via the N-terminal non-penicillin binding domain (n-PBD), this may induce a conformational change of the TM7/8 loop and opening of the pore, allowing the release of lipid II and/or its direct transfer to PBP1b. This mechanism would explain the observed effect of PBP3 on the interaction of FtsW with lipid II (Fig. 6). Alternatively, PBP3 binding could induce a structural rearrangement within the TM domain of FtsW leading to the lipid II release.

A similar mechanism is found in functionally unrelated transferases that use a polyprenyl-sugar carrier as substrate^{48,49}. The archaeal AgIB and the eubacterial PglB, two oligosaccharyltransferase (OST) belonging to family STT3 (staurosporine and temperature sensitive 3), catalyze protein N-glycosylation using polyprenyl-phospho-sugar as a donor. Modeling showed that their folds were related to that of FtsW³⁴. They contain a characteristic long and dynamic loop between TM9 and 10 that oscillates between structured and unstructured states, facilitating the release of the glycosylated product from the active site⁴⁸. ArnT is an OST with a fold similar to that of PglB and AgIB but its function is different. ArnT is involved in the attachment of the undecaprenyl-linked L-Ara4N to lipid A. ArnT also exhibits a flexible periplasmic loop between TM7 and 8 that plays an important function by controlling the lipid A cavity by a structural change⁴⁹.

FtsW and MurJ are both proposed to transport lipid II across the membrane that implicates that they should interact with their substrate. In consequence, this interaction should have an effect on the lipid II polymerization by the glycosyltransferase activity of PBP1b. This hypothesis was verified with FtsW but, in contrast, MurJ had no effect on the activity of PBP1b nor did it bind lipid II. This indicates that the two potential flippases work by different mechanisms. The modulation of the interaction between FtsW and lipid II by PBP3 could stimulate the flippase activity of FtsW. The lack of an interaction of MurJ with lipid II suggests that MurJ may have an indirect function in the process or that an unknown factor may be required for binding and probably the flippase activity, which would explain why MurJ alone was not active in the *in vitro* assay³. Alternatively, the turnover of lipid II by MurJ is fast and the release of lipid II does not require assistance from another protein.

In conclusion, we showed that FtsW, PBP3 and PBP1b form a ternary complex *in vitro*, FtsW interacts with lipid II and that this interaction is modulated by PBP3. We also showed that the loop between TM 7 and 8 is important for the interaction of FtsW with PBP3 and that this interaction may play role in the regulation of FtsW-lipid II interaction. Based on these results we propose a model where lipid II remains attached to FtsW after

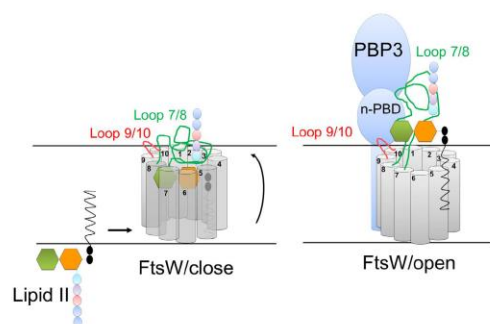


Figure 6. Model of modulation of the FtsW function by PBP3. Left, in the absence of PBP3, lipid II is loaded into the pore of FtsW and translocated but cannot be released. Right, Interaction of PBP3 with FtsW induces conformational changes in the loop between TM 7 and 8, opening the pore gate and allowing the release of lipid II. The loop between TMs 9 and 10 is required for the localisation of PBP3 at the septum.

Strain/plasmids	Relevant genetic marker (s) or features	Sources/reference
E. coli Strains		
Mach-1	$\Delta recA1398 \text{ endA1 } tonA \Phi 80 \Delta lacM15 \Delta lacX74 \text{ hsdR } (r_K^- \text{ } \kappa^+)$	Invitrogen
C43 (DE3)	$F^- \text{ ompT gal dcm hsdS}_B (r_K^- \text{ } m_B^-)$ (DE3)	56
Lemo21 (DE3)	$ftsA2 [\text{lon}] \text{ ompT gal } (\lambda \text{ DE3}) [\text{dcm}] \Delta \text{ hsdS/pLemo } (\text{Cam}^R)$	New England Biolabs
Plasmids		
pDML924	pET28a, His- <i>ponB</i>	50
pDML924 (S510A)	pET28a, His- <i>ponB</i> (S510A)	This work
pDML2032	pET22b, <i>ftsN</i> -His	This work
pDML2422	pMCL210- <i>ftsW</i> -293HA	18
pDML2400	pET28a, His- <i>ftsW</i>	18
pDML2040	pETDuet, His- <i>ftsI</i> , <i>ftsW</i>	This work
pDML2041	pETDuet, His- <i>ftsW</i> , <i>ftsI</i>	This work
pDML2043	pETDuet, His- <i>ftsI</i> , <i>ftsW</i> (293HA)	This work
pDML2045	pACYCDuet, <i>ponB</i> , <i>ftsN</i> -S. <i>tag</i>	This work
pCIP1000	pETDuet, His- <i>ftsW</i> , <i>ponB</i>	This work
pCIP1083	pETDuet, His- <i>ftsW</i> _{H1A} , <i>ponB</i>	This work
pET28MHL-WSe	pET28MHL, His- <i>ftsW</i> Se	This work
pET28MHL-WKp	pET28MHL, His- <i>ftsW</i> Kp	This work
pCIP1051	pETDuet, His- <i>murJ</i>	This work

Table 1. Strains and plasmids constructs.

its transport across the cytoplasmic membrane and that its release and/or transfer to PBP1b is facilitated by PBP3 via allosteric conformational changes probably involving the loop between TM 7 and 8 of FtsW and/or the TM domain. This regulatory mechanism may ensure that the limited and precious lipid II precursor is not spuriously flipped to a non-productive end.

Experimental Procedures

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. Bacterial strains and plasmids are described in Table 1. Plasmids constructions are described in the supporting information. Oligonucleotides (Table S1) were purchased from Eurogentec (Angleur, Belgium). Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with ampicillin (50 $\mu\text{g/ml}$) (from MP Biomedicals) or chloramphenicol (30 $\mu\text{g/ml}$) (from Sigma) or Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) (from MP Biomedicals).

Reagents. Dansyl-lipid II, NBD-lipid II and [^{14}C]-lipid II (0.155 $\mu\text{Ci/nmol}$) were prepared as previously described^{50,51}. Flavomycin was a gift from Aventis (Romainville, France). Fluorescein labelled ampicillin was prepared as previously described⁵².

Expression and purification of the proteins. *E. coli* PBP1b and PBP1b-S510A were expressed and purified as previously described⁵⁰. LpoB (sol) was purified as described²⁵.

E. coli FtsW, PBP3 or the PBP3-FtsW complex were expressed in *E. coli* strain C43 (DE3) harboring plasmids pDML2400, pDML2040, pDML2041 or pDML2043. Bacteria were grown at 37 °C, in LB medium supplemented with the appropriate antibiotic to an A_{600nm} of 0.6. Then expression was induced for 4–5 hours by addition of 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were collected by centrifugation at $8000 \times g$ for 20 minutes at 15 °C and resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1.5 U ml^{-1} benzonase (EMD Millipore) and EDTA-free protease inhibitor Cocktail (Roche). The bacterial cells were lysed by three passages through a cell homogenizer (Emulsiflex C3 Avestin[®]). The cell lysate was spun down at $150,000 \times g$ for 1 hour at 4 °C and then the membranes were resuspended and washed in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glycerol and complete EDTA-free protease inhibitors. The membranes were collected by centrifugation at $150,000 \times g$ for 1 hour at 4 °C and solubilized in 50 mM Hepes pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glycerol, 40 mM *n*-dodecyl- β -D-maltopyranoside (DDM; Inalco[®]) and complete EDTA-free protease inhibitors. The mixture was incubated for 1 hour at room temperature followed by centrifugation at $150,000 \times g$ for 1 hour at 4 °C, the supernatant containing the solubilized membrane proteins or complexes were purified by Ni-affinity chromatography.

The samples were loaded onto a HisTrap column (GE HealthCare) conditioned in buffer A (50 mM Hepes, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 50 mM imidazole and 1 mM DDM). The proteins or complexes of proteins were eluted by an imidazole gradient (0.05–1 M). After SDS-PAGE analysis, pure fractions were pooled and desalted on a G25 Sephadex column and concentrated using an Amicon apparatus (EMD Millipore) with a 50 kDa cutoff membrane (for PBP3 and FtsW) or a 100 kDa cutoff (for the complex) and stored at $-20^\circ C$. The concentrations of the proteins or complexes were determined with the help of the BCA reagent kit (ThermoFisher Scientific).

The expression and purification procedures of the His-tagged FtsW-PBP1b and the ternary HisPBP3-FtsW-PBP1b complexes were similar to those described above, except that the membranes were solubilized with 40 mM of Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG, Anatrace) instead of DDM and that the purification was carried out in buffer B (50 mM Hepes, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% glycerol and 0.2 mM LMNG).

Before the analysis of the fractions containing PBPs by SDS-PAGE, the samples were labelled with fluorescent ampicillin at $10 \mu M$ for 30 minutes at 37 °C.

FtsWs from *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella enterica* were expressed in *E. coli* Lemo21 (DE3) strain (New England Biolabs, Ipswich, MA). Cells were grown at 37 °C in LB medium until the cell density reached an A_{600nm} of 0.4. The temperature was then decreased to 22 °C before induction with 0.8 mM IPTG and 100 μM rhamnose. After growth at 22 °C for 16 h, cells were harvested by centrifugation at $8000 \times g$. Cells were resuspended in cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM $MgCl_2$ and 2 mM β -mercaptoethanol) and disrupted by a homogenizer (Emulsiflex C3 Avestin[®]). The cell lysate was centrifuged at $15,000 \times g$ for 15 min at 4 °C, and the supernatant was then ultracentrifuged at $150,000 \times g$ for 1 hour. The membrane fractions were resuspended in buffer C (25 mM Sodium Phosphate pH 7, 500 mM NaCl, 5% (vol/vol) glycerol and 2 mM β -mercaptoethanol) supplemented with 40 mM DDM. After another ultracentrifugation at $150,000 \times g$ for 30 min, the supernatant was collected and purified by affinity chromatography on a HisTrap column (GE Healthcare). Fractions containing the purified protein were pooled, desalted on a Sephadex G25 column equilibrated with buffer C, concentrated using the Amicon apparatus with 50 kDa cutoff membrane (EMD Millipore) and stored at $-20^\circ C$.

E. coli MurJ was expressed in *E. coli* C43 (DE3) and purified on the Ni-NTA column as described above except that the expression was induced with 0.2 mM IPTG and that the protein purified in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5% glycerol and 2 mM β -mercaptoethanol.

Continuous fluorescence assay. The PBP1b activity assays with dansyl lipid II as substrate were performed as described^{43,37} in a medium binding black 96-well microplate (Greiner Bio One). The samples contained 10 μM dansyl-lipid II, 50 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 0.02% of decyl-PEG, 20% of dimethylsulfoxide (DMSO), 1000 unit ml^{-1} of penicillin G, when required, and 1 unit of *N*-acetylmuramidase of *Streptococcus globisporus* (Calbiochem). The proteins FtsW, PBP3, the FtsW-PBP3 complex or MurJ, were used at 0.5–5 μM concentrations and LpoB at 200 nM. The reactions were initiated by the addition of 50 nM PBP1b or PBP1b (S510A). The reaction was monitored by following the fluorescence decrease over 20–30 min at 30 °C using an Infinite 200 PRO Microplate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) with excitation at 340 nm and emission at 520 nm.

Analysis of glycan chains by SDS-PAGE. *In vitro* PG polymerization from radioactive lipid II was performed in 50 mM Hepes pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$, 200 mM NaCl, 0.02% decyl-PEG, 10% DMSO, 4 μM [¹⁴C]-lipid II (0.155 $\mu Ci \cdot nmol^{-1}$) and 100 nM PBP1b or PBP1b (S510A). FtsW, PBP3, and the FtsW-PBP3 complex or MurJ were used at 3 μM . The samples were incubated at 37 °C for 1 hour and the reactions were stopped by the addition of Flavomycin (5 mM). The reaction products were analyzed by 9% SDS-PAGE as described⁵³. The gels were dried, exposed to a storage phosphor screen (GE Healthcare) and imaged with a Typhoon Trio+ (GE Healthcare).

The interactions of lipid II with FtsW complex was also analyzed using the same procedure with modification: SDS was omitted in the gel and the loading buffer and was only added in the running buffer.

Analysis of the reactivity of FtsW with lipid II by TLC. 4 μM [¹⁴C]-lipid II was incubated with 2 μM of purified *E. coli*, *K. pneumoniae* or *S. enterica* FtsW proteins in 50 mM Hepes/NaOH pH7.0, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$, 20% DMSO and 0.05% DDM for 2 h at 30 °C. PBP1b (100 nM) was incubated in the same condition as control for PG synthesis. The reaction products were separated by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel

plates (Fluka), using 2-propanol–ammonium hydroxide (25%)–water (6:3:1, vol/vol/vol) as the mobile phase. The TLC plates were exposed to a storage phosphor screen (GE Healthcare) for 16 h, and images were revealed using a Typhoon Trio imager. The images were analyzed using Image Quant TL software (GE Healthcare).

In vitro peptidoglycan synthesis assay with HPLC analysis of product. Performed as described previously⁵⁴ with changes to the buffer conditions. Reactions were performed either in a solution of 10 mM Hepes/NaOH, 3 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 0.04% DDM (w/v), pH 7.5 or in 20 mM Hepes/NaOH, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 10% DMSO, 0.05% DDM (w/v), pH 7.5. Lipid II substrate was dried and re-dissolved in 5 μL of 0.1% DDM prior to mixing with the appropriate enzyme/protein mixtures to give 15 μM final concentration. Combinations of 0.5 μM PBP1b with 2 or 5 μM of FtsW or FtsW-PBP3 complex in the presence or absence of 2 μM LpoB (sol). Reaction proceeded for 2 h at 37 °C. Processing of PG product for HPLC analysis was as described⁵⁴.

Analysis of lipid II-proteins interaction by Native-PAGE. Native-PAGE was performed essentially as described⁵⁵ using a 4–15% gel gradient in glycine buffer pH 10.6. The samples: NBD-lipid II (10 μM), or lipid II-protein (10 μM/5 μM) mixtures containing FtsW, the FtsW-PBP3 complex or MurJ were supplemented with 5% sucrose before electrophoresis. The gels were imaged with a Typhoon Trio+ (GE Healthcare) followed by Coomassie blue staining.

Western blotting. After SDS-PAGE, the proteins were electro-transferred to a PVDF membrane and probed by incubation with monoclonal anti-HA antibodies (Abcam). Immuno detection was done using peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibodies (Millipore). The proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL kit, GE Healthcare).

References

- Vollmer, W., Blanot, D. & de Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 149–167 (2008).
- Egan, A. J. F. & Vollmer, W. The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci* **1277**, 8–28 (2013).
- Mohammadi, T. *et al.* Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J* **30**, 1425–32 (2011).
- Sham, L.-T. *et al.* Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* **345**, 220–2 (2014).
- Ruiz, N. Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Lipid Insights* **8**, 21–31 (2015).
- Sauvage, E. & Terrak, M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics* **5**, 12 (2016).
- Sauvage, E., Kerff, F. F., Terrak, M., Ayala, J. A. & Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 234–258 (2008).
- Gray, A. N. *et al.* Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. *Elife* **4** (2015).
- Gerding, M. A., Ogata, Y., Pecora, N. D., Niki, H. & de Boer, P. A. J. The trans-envelope Tol-Pal complex is part of the cell division machinery and required for proper outer-membrane invagination during cell constriction in *E. coli*. *Mol Microbiol* **63**, 1008–25 (2007).
- Aarsman, M. E. *et al.* Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps. *Mol Microbiol* **55**, 1631–1645 (2005).
- Buddelmeijer, N. & Beckwith, J. A complex of the *Escherichia coli* cell division proteins FtsL, FtsB and FtsQ forms independently of its localization to the septal region. *Mol Microbiol* **52**, 1315–1327 (2004).
- Fraipont, C. *et al.* The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*. *Microbiology* **157**, 251–9 (2011).
- Goehring, N. W., Gonzalez, M. D. & Beckwith, J. Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol Microbiol* **61**, 33–45 (2006).
- Mercer, K. L. N. & Weiss, D. S. The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J Bacteriol* **184**, 904–12 (2002).
- Bertsche, U. *et al.* Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **61**, 675–690 (2006).
- Müller, P. *et al.* The Essential Cell Division Protein FtsN Interacts with the Murein (Peptidoglycan) Synthase PBP1B in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **282**, 36394–36402 (2007).
- Mohammadi, T. *et al.* Specificity of the transport of lipid II by FtsW in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **289**, 14707–18 (2014).
- Pastoret, S. *et al.* Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 8370–8379 (2004).
- Hvorup, R. N. *et al.* The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur J Biochem* **270**, 799–813 (2003).
- Elhenawy, W. *et al.* The O-Antigen Flippase Wzk Can Substitute for MurJ in Peptidoglycan Synthesis in *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. *PLoS One* **11**, e0161587 (2016).
- Meeske, A. J. *et al.* MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 6437–42 (2015).
- Meeske, A. J. *et al.* SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* **537**, 634–638 (2016).
- Paradis-Bleau, C. *et al.* Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell* **143**, 1110–20 (2010).
- Typas, A. *et al.* Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell* **143**, 1097–109 (2010).
- Egan, A. J. F. *et al.* Outer-membrane lipoprotein LpoB spans the periplasm to stimulate the peptidoglycan synthase PBP1B. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 8197–202 (2014).
- Liu, B., Persons, L., Lee, L. & de Boer, P. A. J. Roles for both FtsA and the FtsBLQ subcomplex in FtsN-stimulated cell constriction in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **95**, 945–70 (2015).
- Tsang, M.-J. & Bernhardt, T. G. A role for the FtsQLB complex in cytokinetic ring activation revealed by an ftsL allele that accelerates division. *Mol Microbiol* **95**, 925–44 (2015).
- Trip, E. N. & Scheffers, D.-J. A 1 MDa protein complex containing critical components of the *Escherichia coli* divisome. *Sci Rep* **5**, 18190 (2015).
- Noirclerc-Savoie, M. *et al.* Reconstitution of membrane protein complexes involved in pneumococcal septal cell wall assembly. *PLoS One* **8**, e75522 (2013).
- Di Lallo, G., Fagioli, M., Barionovi, D., Ghelardini, P. & Paolozzi, L. Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology* **149**, 3353–9 (2003).

31. Karimova, G., Dautin, N. & Ladant, D. Interaction network among Escherichia coli membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* **187**, 2233–43 (2005).
32. Piette, A. *et al.* Structural determinants required to target penicillin-binding protein 3 to the septum of Escherichia coli. *J Bacteriol* **186**, 6110–7 (2004).
33. Wissel, M. C., Wendt, J. L., Mitchell, C. J. & Weiss, D. S. The transmembrane helix of the Escherichia coli division protein FtsI localizes to the septal ring. *J Bacteriol* **187**, 320–8 (2005).
34. Ovchinnikov, S. *et al.* Large scale determination of previously unsolved protein structures using evolutionary information. *Elife* **4**, e09248 (2015).
35. Khattar, M. M. *et al.* Two polypeptide products of the Escherichia coli cell division gene ftsW and a possible role for FtsW in FtsZ function. *J Bacteriol* **179**, 784–93 (1997).
36. Schwartz, B., Markwalder, J. A., Seitz, S. P., Wang, Y. & Stein, R. L. A kinetic characterization of the glycosyltransferase activity of Escherichia coli PBP1b and development of a continuous fluorescence assay. *Biochemistry* **41**, 12552–12561 (2002).
37. Egan, A. J. F. & Vollmer, W. Continuous Fluorescence Assay for Peptidoglycan Glycosyltransferases. *Methods Mol Biol* **1440**, 171–84 (2016).
38. Bertsche, U., Breukink, E., Kast, T. & Vollmer, W. *In vitro* murein peptidoglycan synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from Escherichia coli. *J Biol Chem* **280**, 38096–38101 (2005).
39. Born, P., Breukink, E. & Vollmer, W. *In vitro* synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from Escherichia coli. *J Biol Chem* **281**, 26985–26993 (2006).
40. Egan, A. J. F., Biboy, J., van't Veer, I., Breukink, E. & Vollmer, W. Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **370**, 20150031 (2015).
41. Khattar, M. M., Begg, K. J. & Donachie, W. D. Identification of FtsW and characterization of a new ftsW division mutant of Escherichia coli. *J Bacteriol* **176**, 7140–7 (1994).
42. Cho, H. *et al.* Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously. *Nat Microbiol* **1**, 16172 (2016).
43. Hölte, J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 181–203 (1998).
44. Banzhaf, M. *et al.* Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol* **85**, 179–194 (2012).
45. Yousif, S. Y., Broome-Smith, J. K. & Spratt, B. G. Lysis of Escherichia coli by beta-lactam antibiotics: deletion analysis of the role of penicillin-binding proteins 1A and 1B. *J Gen Microbiol* **131**, 2839–45 (1985).
46. Reed, P., Veiga, H., Jorge, A. M., Terrak, M. & Pinho, M. G. Monofunctional transglycosylases are not essential for Staphylococcus aureus cell wall synthesis. *J Bacteriol* **193**, 2549–2556 (2011).
47. Datta, P. *et al.* Interaction between FtsW and penicillin-binding protein 3 (PBP3) directs PBP3 to mid-cell, controls cell septation and mediates the formation of a trimeric complex involving FtsZ, FtsW and PBP3 in mycobacteria. *Mol Microbiol* **62**, 1655–73 (2006).
48. Matsumoto, S. *et al.* Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 17868–73 (2013).
49. Petrou, V. I. *et al.* Structures of aminoarabinose transferase ArnT suggest a molecular basis for lipid A glycosylation. *Science* (80-) **351**, 608–612 (2016).
50. Terrak, M. *et al.* The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of Escherichia coli. *Mol Microbiol* **34**, 350–364 (1999).
51. Breukink, E. *et al.* Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. *J Biol Chem* **278**, 19898–19903 (2003).
52. Lakaye, B. *et al.* Synthesis, purification and kinetic properties of fluorescein-labelled penicillins. *Biochem J* **300** Pt 1, 141–145 (1994).
53. Barrett, D. *et al.* Analysis of glycan polymers produced by peptidoglycan glycosyltransferases. *J Biol Chem* **282**, 31964–31971 (2007).
54. Biboy, J., Bui, N. K. & Vollmer, W. *In vitro* peptidoglycan synthesis assay with lipid II substrate. *Methods Mol Biol* **966**, 273–88 (2013).
55. Gallagher, S. R. One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter **10**, Unit 10.2B (2001).
56. Miroux, B. & Walker, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* **260**, 289–298 (1996).

Acknowledgements

We thank Badrish Soni, Sebastien De Boel, and Marie Schlosser for their help during this work. We are grateful to Martine Nguyen-Distèche and Jean-Marie Frère for comments on the manuscript. This work was supported by the Fonds de la Recherche Scientifique, FRFC n° 2.4543.12, the Belgian Science Policy program IAP 7/44 iPros and a Wellcome Trust Senior Investigator grant to WV (101824/Z/13/Z). MT is a research associate of the FRS_FNRS (Brussels, Belgium), SL is supported by FRIA (Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture) fellowship FRS_FNRS.

Author Contributions

S.L., A.D., S.O., C.F. performed research. E.B. prepared dansyl and NBD labeled lipid II. W.V. and A.J.F.E., prepared LpoB, performed the TP experiments and edited the MS. M.T. designed the experiments, analyzed the data and wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Leclercq, S. *et al.* Interplay between Penicillin-binding proteins and SEDS proteins promotes bacterial cell wall synthesis. *Sci. Rep.* **7**, 43306; doi: 10.1038/srep43306 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

www.nature.com/scientificreports/



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

